

# Genotoksični učinci hipertermije, citostatika cisplatine i kvercetina na zdrave i tumorske stanice miša

---

Kunštić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:185216>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Martina Kunštić**

GENOTOKSIČNI UČINCI HIPERTERMIJE,  
CITOSTATIKA CISPLATINE I KVERCETINA NA  
ZDRAVE I TUMORSKE STANICE MIŠA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2010.

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Martina Kunštić**

GENOTOKSIČNI UČINCI HIPERTERMIJE,  
CITOSTATIKA CISPLATINE I KVERCETINA NA  
ZDRAVE I TUMORSKE STANICE MIŠA

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

# *ZAHVALA*

*Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na nesebičnom pomaganju, savjetima i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Svim suradnicima Zavoda za animalnu fiziologiju iskreno zahvaljujem na stručnoj i tehničkoj pomoći koju su mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko HVALA cijeloj mojoj obitelji na razumijevanju i bezuvjetnoj potpori tijekom studiranja!*

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## GENOTOKSIČNI UČINCI HIPERTERMIJE, CITOSTATIKA CISPLATINE I KVERCETINA NA ZDRAVE I TUMORSKE STANICE MIŠA

MARTINA KUNŠTIĆ

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

### SAŽETAK

Bioflavonoid kvercetin je polifenolni spoj široko rasprostranjen u biljnom svijetu, poznat po svojim antioksidativnim, protutumorskim, imunomodulatorskim i protuupalnim svojstvima. Također je dokazano da djeluje kao senzibilizator hipertermije povećavajući apoptozu u različitim linijama tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo*. Cilj ovog istraživanja bio je pratiti procjenu protutumorske, genotoksične i imunomodulatorske učinkovitosti citostatika cisplatine i/ili imunomodulatora kvercetina sa i bez primjene hipertermije na miševе nositelje Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT-a) metodom alkalnog komet testa. Miševе soja Swiss albino preventivno smo obradili intraperitonealno (*i.p.*) pripravkom kvercetina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 7. i 3. dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica. Kemoterapiju ( $37^\circ\text{C}$ ) i hipertermičku kemoterapiju ( $43^\circ\text{C}$ ) s citostatikom cisplatinom (5 ili  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) primijenili smo 3. dan nakon injiciranja tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu. Rezultati alkalnog komet testa ukazuju na sinergistički učinak hipertermije, kemoterapije te imunoterapije s kvercetinom u povećanoj zaštiti molekula DNA u leukocitima, hepatocitima i stanicama bubrega od oštećenja uzrokovanih toksičnim metabolitima cisplatine. Imunomodulacija kvercetinom te smanjena toksičnost citostatika cisplatine s kvercetinom vjerojatno je mogući mehanizam protutumorske učinkovitosti. Analizom rezultata zaključili smo da kvercetin združen s citostatikom cisplatinom može povećati protutumorski učinak kemoterapeutika, što sugerira moguću kliničku upotrebu u cilju povećanja imunosti organizma te smanjenja štetnih učinaka toksičnih metabolita citostatika cisplatine na zdrave stanice i tkiva.

**Rad sadrži:** stranica-VII+95, slika-12, tablica-10, literaturnih navoda-139.

Izvornik je napisan na hrvatskom jeziku.

Rad je pohranjen u centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.

**Ključne riječi:** kvercetin, cisplatina, hipertermija, Ehrlichov ascitesni tumor, komet test

**Mentor:** Dr. sc. Nada Oršolić, izv. prof.

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Nada Oršolić, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, doc.

Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, doc.

**Zamjena:** Dr. sc. Domagaj Đikić, doc.

Rad prihvaćen: 10. veljače 2010.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

# GENOTOXIC EFFECTS OF HYPERTHERMIA, CYTOSTATIC CISPLATIN AND QUERCETIN ON NORMAL AND TUMOUR CELLS IN MICE

MARTINA KUNŠTIĆ

Laboratory of Animal Physiology, Department of Biology  
Faculty of Science, University of Zagreb  
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

### SUMMARY

The bioflavonoid quercetin, a polyphenolic compound widely distributed in the plant kingdom, is known to its antioxidative, antitumour, immunomodulative, and anti-inflammatory properties. It also has been shown to act as a hyperthermia sensitizer by increasing the apoptosis in a variety of tumour cell lines both *in vitro* and *in vivo*. The aim of this study was to explore and compare antitumour, genotoxic and immunomodulatory effects of cytostatic cisplatin and/or immunomodulator quercetin with and without hyperthermia in mice-bearing Ehrlich ascites tumour (EAT) using the method of alkaline comet assay. In Swiss albino mice preventively treated intraperitoneally (*i.p.*) by quercetin (50 mg kg<sup>-1</sup>) on the 7th and 3rd day before *i.p.* injection of 2x10<sup>6</sup> EAT cells. Chemotherapy (37°C) and hypothermic chemotherapy (43°C) with cisplatin (5 or 10 mg kg<sup>-1</sup>) were given on the 3rd day after the tumour cell injection into the abdominal cavity of mice. These results of alkaline comet assay suggest the synergistic effect of hyperthermia, chemotherapy and immunotherapy with quercetin in increased DNA protection of leukocytes, hepatocytes and kidney cells from damages caused by toxic metabolites of cisplatin. It is likely that immunomodulation of quercetin and reducing toxicity of chemotherapy treatment with quercetin may be possible mechanism of antitumour efficiency. The analysis of the results has led us to the conclusion that the combination of quercetin with cytostatic cisplatin could increase the antitumour potential of chemotherapeutic agents which suggests the benefits of potential clinical use in order to maximize immunity of organism and minimize harmful effects of toxic metabolites of cytostatic cisplatin on normal cells and tissues.

**Thesis includes:** pages-VII+95, figures-12, tables-10, references-139.

The original is in Croatian.

Thesis deposited in Central library of Department of Biology, Rooseveltova trg 6.

**Keywords:** quercetin, cisplatin, hyperthermia, Ehrlich ascites tumour, comet assay

**Supervisor:** Dr. Nada Oršolić, Assoc. Prof.

**Reviews:** Dr. Nada Oršolić, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Asst. Prof.

Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof.

**Substitute:** Dr. Domagaj Đikić, Asst. Prof.

Thesis accepted: February, the 2nd, 2010.

# SADRŽAJ

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>V</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. POLIFENOLI</b> .....	<b>5</b>
2.1.1. FLAVONOIDI .....	5
2.1.1.1. <i>Kvercetin</i> .....	9
2.1.2. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA FLAVONOIDA .....	10
2.1.3. IMUNOMODULATORSKA SVOJSTVA FLAVONOIDA .....	14
<b>2.2. TUMORI</b> .....	<b>16</b>
2.2.1. RAST TUMORSKOG ČVORA.....	21
2.2.1.1. <i>Tumorska angiogeneza</i> .....	21
2.2.1.2. <i>Metastaziranje</i> .....	22
2.2.2. MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORA .....	27
2.2.3. IMUNOSNO PREPOZNAVANJE TUMORSKE STANICE.....	29
2.2.3.1. <i>Tumorski antigeni</i> .....	33
2.2.3.2. <i>Imunoreakcija na tumor</i> .....	35
2.2.3.3. <i>Izmicanje tumora imunosnoj obrani</i> .....	37
<b>2.3. TERAPIJSKI POSTUPCI</b> .....	<b>39</b>
<b>2.4. IMUNOTERAPIJA</b> .....	<b>43</b>
<b>2.5. HIPERTERMIJA</b> .....	<b>45</b>
2.5.1. TERAPIJSKI MODALITETI HIPERMIJE .....	46
2.5.2. BIOLOŠKI UČINCI HIPERTERMIJE.....	47
2.5.3. FAKTORI KOJI UTJEČU NA HIPERTERMIJSKI UČINAK .....	48
2.5.4. HIPERTERMIJA I KEMOTERAPIJA .....	49
<b>2.6. KEMOTERAPIJA</b> .....	<b>49</b>
2.6.1. CITOSTATICI .....	51
2.6.1.1. <i>Cisplatina</i> .....	55
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>57</b>
<b>3.1. MATERIJALI KORIŠTENI U ISTRAŽIVANJU</b> .....	<b>58</b>
3.1.1. POKUSNE ŽIVOTINJE .....	58
3.1.2. TUMORSKE STANICE .....	58
3.1.3. KVERCETIN .....	59
3.1.4. CISPLATINA.....	59



<b>3.2. METODE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU .....</b>	<b>59</b>
3.2.1. POSTUPAK SA ŽIVOTINJAMA .....	59
3.2.2. INTRAPERITONEALNA HIPERTERMIJA .....	59
3.2.3. KOMET TEST .....	60
3.2.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	62
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>63</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>75</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>82</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>84</b>

# ***1. UVOD***

Tumori su poznati od davnina kao abnormalna nakupina tkiva čiji je rast nesvrhovit, autonoman i nadmašuju rast normalnog tkiva. Tome u prilog govori i činjenica da je rak ustanovljen rentgenskim zrakama na iskopanim kostima pračovjeka, te na staroegipatskim mumijama. Spominje se i u starim medicinskim rukopisima iz Egipta i Mezopotamije. Sve te činjenice dokazuju postojanje te opake bolesti još od pradavnih vremena, a ne kako se često govori o pošasti novijeg doba.

Po učestalosti pojavljivanja rak je drugi po redu ubojica, odmah iza kardiovaskularnih bolesti i odgovoran je za oko četvrtinu (25%) svih smrti. S obzirom na to da je neprestano u porastu (oko 1% na godinu), rak bi se uskoro mogao pretvoriti u ubojicu broj jedan (Pavelić, 2004). Obično se na jednog umrlog od raka otkriju dva novooboljela. Obolijevanje od tumora i dalje je u porastu u većini nerazvijenih, kao i zemalja u razvoju, premda razvijene zemlje Zapada, primjerice SAD bilježe smanjenje ukupnog broja novootkrivenih zloćudnih tumora, kao i smanjenje smrtnosti izazvanih tim tumorima (podaci *American Cancer Society*, 1998). Prema određenim statističkim podacima, danas svaki peti čovjek u razvijenim zemljama umire od raka, a oko trećina oboljenih uspješno se liječi.

Vjeruje se da su 4 čimbenika bitna za porast broja oboljenih od raka, a to su: dob, prehrana, okoliš i gensko naslijeđe. Prema današnjim saznanjima svega 5 – 10% svih tumora pripada u kategoriju naslijednih (Pavelić, 2000). Velika većina ostalih tumora posljedica su više somatskih mutacija koje vode ka zloćudnoj preobrazbi. Spoznaja da je rak posljedica nakupljnja genetičkih pogrešaka u duljem razdoblju ima svoju potvrdu u činjenici da učestalost raka znatno raste s dobi. Stanice raka su besmrtni, a tome u prilog govori i činjenica da stanice raka posjeduju povećanu količinu telomeraza, stvarajući i čuvajući tako duljinu telomera (slijed nukleotida TTAGGG koji su umnoženi do 10 000 puta na krajevima kromosoma kralježnjaka i sprječavaju skraćivanje kromosoma pri svakoj staničnoj diobi). U normalnim stanicama ljudskog organizma telomeraza nema, pa nema ničega što bi održalo duljinu telomera (Jukić i sur., 2002). Svi tumori, osobito zloćudni, skloni su sekundarnim promjenama, kao što su degeneracija, nekroze, upale, krvarenja i edem koje često uzrokuju promjene tumora. Najčešće se to očituje naglijom promjenom veličine i konzistencije tumora (Jukić i sur., 2002).

Kroz povijest se na različite načine pokušavalo spriječiti nastanak raka, koristeći razne biljne pripravke, minerale, masti pa čak i odstranjivanje bolesnog tkiva kirurškim metodama. No nažalost još uvijek ne postoji jedinstvena metoda izliječenja, ali je uz rano dijagnosticiranje i određene terapijske metode izliječenje moguće.

Upotreba imunomodulatora, tvari koje reguliraju imunološki sustav, postala je uobičajena kao i sama svijest o važnosti zdravog imunološkog sustava koji je potreban za održavanje zdravlja i prevencije razvitka bolesti. Imunomodulacija je stoga proces koji može popraviti funkcioniranje imunološkog sustava pomoću prirodnih ili sintetskih tvari koje aktiviraju ili suprimiraju njegovu funkciju. Taj koncept ustanovio je 1796. godine engleski liječnik i prirodoslovac Edward Jenner upotrijebivši prvo cijepivo protiv ljudskih boginja (Fischer i Vidor, 2008). Danas se upotreba propolisa i flavonoida kao imunomodulatorskih pripravaka sve više razmatra kao alternativni oblik u prevenciji i liječenju nekoliko različitih bolesti.

Flavonoidi kao polifenolni biološki aktivni spojevi sve su više zastupljeni u znanstvenim istraživanjima upravo zbog svojih mnogobrojnih potencijalnih koristi na ljudsko zdravlje kao što su antioksidativno (Bors i sur., 2001; Cotelle, 2001; Heim i sur., 2002; Prior, 2003; Williams i sur., 2004), kemopreventivno i protutumorsko (Middleton i sur., 2000; Caltagirone i sur., 2000; Rice-Evans, 2001; Galati i O'Brien, 2004; Oršolić i sur., 2002; 2003b; 2004a; 2005b), imunomodulatorsko (Damre i sur., 2003; Oršolić i Bašić, 2003a,b; 2005a,b; Oršolić i sur., 2003b; 2004b; 2005a,b,c), protuupalno (Narayana i sur., 2001; Nijveldt i sur., 2001; Yamamoto i Gaynor, 2001) djelovanje i još mnogi drugi. Citotoksičnost različitih flavonoida posljedica je njihove kemijske strukture (Plochmann i sur., 2007). Oršolić i sur. (2006) utvrdili su da flavonoidi djeluju selektivno na tumorske stanice u odnosu na normalne, te da izazivaju apoptozu u transformiranim stanicama glodavaca i ljudskih stanica u kulturi što je uostalom sukladno i sa drugim autorima. Smatra se da je pojačana osjetljivost transformiranih stanica na flavonoide kao protutumorske tvari povezana s nesposobnošću transformiranih stanica da sintetiziraju glutation kao odgovor na oksidativni stres (Lee i sur., 1989; Meister, 1994).

## ***CILJ RADA***

Cilj ovog rada je istražiti protutumorsku, genotoksičnu i imunomodulatorsku učinkovitost citostatika cisplatine i flavonoida kvercetina te združeni učinak cisplatine i kvercetina u normalnim stanicama (stanice krvi, jetre i bubrega) te stanicama tumora u miševa nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora te utvrditi mogući mehanizam protutumorske i imunomodulatorske učinkovitosti nakon preventivne obrade miševa u uvjetima njihove fiziološke tjelesne temperature (37°C) i u uvjetima hipertermije (43°C).

## ***2. LITERATURNI PREGLED***

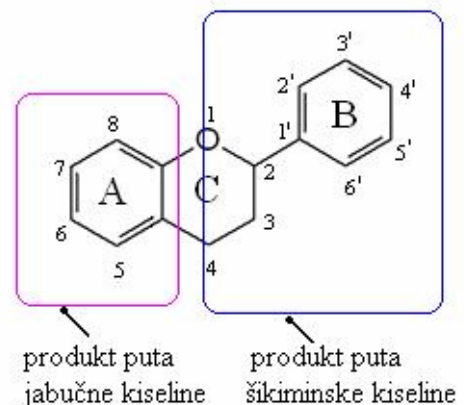
## 2.1. POLIFENOLI

Polifenoli su raznovrsna skupina kemijskih spojeva iz biljnog svijeta s brojnim potencijalno korisnim svojstvima u pogledu sprječavanja bolesti i starenja. Oni se klasificiraju kao antioksidansi, što znači da mogu ukloniti slobodne radikale iz tijela koji uzrokuju oštećenja stanica i tkiva u tijelu, a također i kao prooksidansi koji mogu inducirati apoptozu i blokirati djelovanje enzima koji su potrebni za rast tumora, smanjiti faktore rizika za kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, kronične bolesti, dijabetes, osteoporozu, smanjiti razinu "lošeg" LDL kolesterola i dr. (Middleton i sur., 2000; Yang i sur., 2001, Yamashita i sur., 2002; Arts i sur., 2005; Joseph i sur., 2005; Lambert i sur., 2005; Vita, 2005). Prema kemijskoj građi (broju fenolnih prstenova i supstituenata na njima) polifenole dijelimo na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignine (Manach i sur., 2004).

### 2.1.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi ili bioflavonoidi su jedna od najvećih skupina biljnih polifenola, topljivih u vodi koji se nalaze koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća i povrća, kori drveća, lišću i cvijeću, a za njihovo je otkriće zaslužan mađarski biokemičar, nobelovac Albert Szent-Gyorgi tridesetih godina prošlog stoljeća, točnije 1938. godine dajući im ime "vitamin P" ili "citrin". On je sasvim slučajno otkrio da flavonoidi poboljšavaju apsorpciju vitamina C i štite ga od oksidacije, čime pojačavaju njegovo djelovanje. Flavonoide nazivamo još i sekundarnim metabolitima jer nisu izravno uključeni u rast i razvoj same biljke.

Njihov osnovni kostur sadrži 15 C-atoma raspoređenih u dva aromatska prstena međusobno povezana mostom od 3 C-atoma (Slika 1). Upravo je takva struktura rezultat dva različita biosintetska puta u kojem se most od 3 C-atoma i aromatski prsten B sintetiziraju iz aminokiseline fenilalanina u putu šikiminske kiseline, dok 6 C-atoma prstena A potječu od 3 acetilne jedinice iz puta jabučne kiseline. Reakciju spajanja ova dva dijela katalizira važan



Slika 1. Ugljični kostur flavonoida

regulatorni enzim u sekundarnom metabolizmu, halkon-sintetaza, čiju sintezu osim UV zračenja može potaknuti i infekcija nekim patogenima (Pevalek-Kozlina, 2003).

Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz:

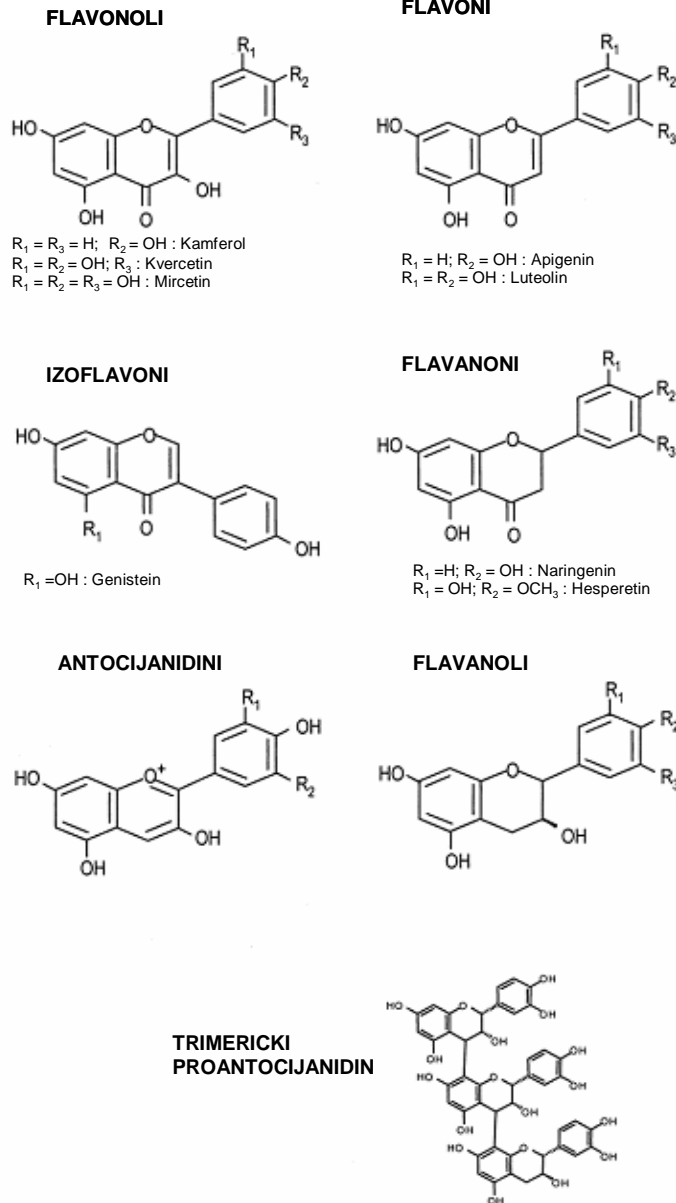
- varijacije u broju i rasporedu hidroksilnih i metoksilnih skupina, te
- prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikolizacije s monosaharidima ili oligosaharidima.

Glikolizacija kod flavonoida događa se najčešće na položaju 3-aromatskog prstena C, a manje u položaju 7-aromatskog prstena A. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza. Kod flavonoida postoji ujedno i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr, tanini).

Flavoniodi koji su zastupljeni u hrani razlikuju se po položaju hidroksilnih, metoksi i glikozidnih skupina, te u konjugaciji između prstena A i B. Flavoniodi u biljkama uglavnom su u obliku 3-O-glikozida ili polimera.

Prema stupnju oksidacije mosta od 3 C-atoma i kemijskoj strukturi flavonoide dijelimo na:

- a) **flavone** (npr. luteolin, apigenin, tangeritin, akacetin, diosmetin, kalangin),
- b) **flavonole** (npr. kvercetin, kamferol, miricetin, fisetin, izoramnetin, ramnatin),
- c) **flavanone** (npr. hesperetin, naringin, naringenin, eriodiktiol, homoeriodiktiol),
- d) **antocijanidine** (npr. cianidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin, peonidin),
- e) **leukoantocijanidi** (npr. leukocijanidin, leukodelfidin, leukomalvidin, leukopeonidin),
- f) **katehine** (npr. katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin),
- g) **kalkone** (npr. alpinetin-kalkon, naringen-kalkon, pinobanksin-kalkon) i
- h) **aurone** (npr. aureusidin, leptosidin, hispidol, sulferetin).



Slika 2. Kemijska struktura flavonoida

Flavonoidi, posebice katehini, su najčešća skupina polifenola prisutna u ljudskoj prehrani (Filippos i sur., 2007), a u samim biljkama imaju različite uloge kao što su pigmentacija cvjetova i plodova, fotoreceptorska aktivnost, obrana od herbivora, insekticidna aktivnost, antimikrobna aktivnost (tzv. fitoaleksini), antioksidacijska aktivnost i zaštita od UV-B zračenja (Pevalek-Kozlina, 2003).

Očito je da su to spojevi koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a došavaši u njih putem hrane, imaju sličnu ulogu i za druga živa bića.

Velika zastupljenost flavonoida u prirodi, kojih je do danas otkriveno više od 8 000 (Cotelle, 2001), njihova raznolikost kao i relativno niska toksičnost u odnosu na druge aktivne



tvari u biljkama (kao npr. alkaloidi) omogućava životinjama, ali i ljudima konzumiranje značajnih količina u prehrani. Nedavna istraživanja pokazala su učinkovitu proizvodnju flavonoida iz mikroorganizama genetskim-inženjeringom (Hwang i sur., 2003; Ververidis i sur., 2007; Trantas i sur., 2009).

Flavonoidi se još nazivaju i "prirodnim modifikatorima biološkog odgovora" zbog mnogih korisnih učinaka na ljudsko zdravlje kao što su: protubakterijsko, protugljivično i protuvirusno djelovanje (Narayana i sur., 2001; Prior, 2003; Galati i O'Brien, 2004; Cushnie i Lamb, 2005), protuosteoporotsko (Hegarty i sur., 2000), protuupalno (Narayana i sur., 2001; Nijveldt i sur., 2001; Yamamoto i Gaynor, 2001), antialergijsko (Oršolić i Bašić, 2007), antioksidativno (Bors i sur., 2001; Cotellet, 2001; Heim i sur., 2002; Prior, 2003; Williams i sur., 2004), prooksidativno (Galati i sur., 2002; Sakihama i sur., 2002; Yen i sur., 2003; Galati i O'Brien, 2004), antiradikalno (Bors i sur., 1990), antimutageno (Brown, 1980; Oršolić i Bašić, 2007), kemopreventivno i protutumorsko (Middleton i sur., 2000; Caltagirone i sur., 2000; Rice-Evans, 2001; Galati i O'Brien, 2004; Oršolić i sur., 2002; 2003b; 2004a; 2005b), a ujedno znatno utječu na boju i okus same hrane.

Lahouel i sur. (2004) dokazali su da flavonoidi izolirani iz propolisa u kombinaciji s citostaticima smanjuju toksične učinke kemoterapeutika na normalne stanice. Utvrdili su zaštitno djelovanje na hematopoezu, te povećanje koncentracije glutaciona u jetri.

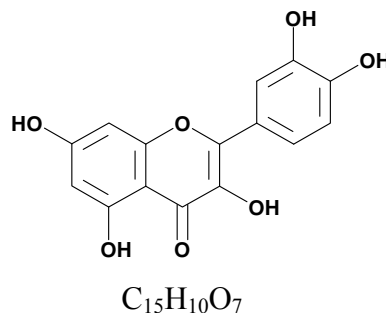
Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Ferrali i sur., 1997), aktiviranja antioksidativnih enzima (Elliott i sur., 1992) i inhibiranja oksidaza (Cos i sur., 1998). To mnogostruko djelovanje vjerojatno je odgovorno za ukupnu učinkovitost tih spojeva, no u određenim eksperimentalnim uvjetima ono predstavlja teškoću u određivanju odnosa struktura-aktivnost (**SAR**). Istraživanja SAR-a posljednjih 15 godina su pokazala da postoji veza između pojedinih strukturnih komponenata i svojstva hvatanja radikala, stvaranja kelatnih kompleksa i antioksidativne aktivnosti. To otkriće omogućuje bolje razumjevanje antioksidativnog i prooksidativnog djelovanja flavonoida i daju prihvatljiva predviđanja utjecaja strukturne promjene na događaje tijekom metabolizma.

Daljni napredak tih istraživanja vodi razvoju hranjivih proizvoda i polusintetskih analoga bitnog antioksidativnog i minimalnog štetnog djelovanja. Mehanizam djelovanja flavonoida na molekularnoj razini u biološkim sustavima nije potpuno razjašnjen, kako zbog velike razlike u kemijskim svojstvima, tako i zbog njihove velike strukturne heterogenosti.

Dobri izvori flavonoida su voće roda *Citrus*, bobičasto voće, lišće *Ginkgo biloba*, luk (Tsushida i Suzuki, 1996; Slimestad i sur., 2007), hmelj, peršin (Justesen i Knutsen, 2001), mahunarke (Ewald i sur., 1999), soja, kava, čaj (pogotovo bijeli i zeleni čaj), crno vino (Kennedy i sur., 2002), pivo, voćni napitci i tamna čokolada (sa 70% kakaa ili više) (Lee i sur., 2003; Schuier i sur., 2005).

### 2.1.1.1. Kvercetin

Kvercetin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon-3-ol ili 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) je glavni predstavnik skupine flavonola koji je poznat po svojoj sposobnosti djelovanja kod peludne groznice, gripe, ekcema (dermatitisa), akutnih i kroničnih upala, dijabetesa, sinusitisa (upala paranazalnih sinusa) i kronične astme, reumatoidnog artritisa, lupusa, te različitih malignih oboljenja kao što su leukemije, rak usta, dojke, jajnika, želuca, jetre, dišnih puteva i debelog crijeva.



**Slika 3.** *Struktura i kemijska formula kvercetina*

Kvercetin je aglikan (nema vezane molekule šećera) kojeg u visokim koncentracijama nalazimo u jabukama, crvenom grožđu, luku, crnom vinu, čajevima, medu, propolisu, brokuli i lišću *Ginkgo biloba* (Slika 3). Brojni biološki učinci kvercetina mogu se objasniti njegovim antioksidativnim učincima i sposobnošću sakupljanja slobodnih radikala (Kawada i sur., 1998; Heim i sur., 2002). Miller (1996) navodi da kvercetin sakuplja slobodne radikale kisika. Kvercetin pokazuje snažniji antioksidativni učinak od vitamina E u zaštiti ljudskih lipoproteina niske gustoće (LDL) od oksidacije, i time dovodi do sprječavanja nastanka aterosklerotskih plakova na unutarnjim stijenkama arterijama (Frankel, 1993), te djeluje i na smanjenje zgrušavanja krvi, a time i na stvaranje krvnih ugrušaka. Antioksidativni učinak kvercetina se pojačava u nazočnosti askorbata (vitamin C). To pojačanje se pripisuje sposobnosti askorbata da reduciraju oksidirani kvercetin, a kvercetina da inhibira

fotooksidaciju askorbata. Kvercetin je dobar protuupalni agens jer izravno blokira nekoliko početnih stadija upalnog procesa; primjerice, kvercetin blokira sintezu i osobađanje histamina i drugih medijatora upale. Nadalje, utvrđeni su korisni učinci kvercetina kao sakupljača radikala i/ili inhibitora lipidne peroksidacije u kombinaciji kvercetina s vitaminom E i askorbinskom kiselinom (Stavrić, 1994). Utvrđeno je da kvercetin pokazuje značajni zaštitni učinak ako se stanice izlože njegovom djelovanju prije izlaganja  $H_2O_2$ . Benković i sur. (2009) navode da je kvercetin u predobradi i terapiji pružio bolju zaštitu od zračenja nego alkoholni pripravak propolisa, a u neozračenih miševa je potaknuo osobađanje većeg broja leukocita u odnosu na negativnu kontrolu. To ukazuje da se kvercetin može koristiti kao radiopreventivno sredstvo od štetnih učinaka ionizirajućeg zračenja. Citotoksičnost kvercetina utvrđena je na različitim linijama leukemijskih stanica kao što su leukemijske stanice T (JURKAT; MOLAT), stanice Burkittova limfoma (RAJI), leukemijske monocitne stanice difuznoga histiocitnog limfoma (U937) i stanice akutne promijelocitne leukemije (HL-60) (Josipović i Oršolić, 2008). Kvercetin može biti i antioksidans i prooksidans, ovisno o koncentraciji i o izvoru slobodnih radikala u stanici (Lee i sur., 2003). Kioka i sur. (1992) navode da kvercetin inhibira porast ekspresije gena MDR1 (engl. *multidrug resistance gene*) koji kodira P-glikoprotein (P-gp) u humanim stanicama karcinoma jetre (HppG<sub>2</sub>). Kvercetin je doveo do inhibicije rasta u mnogih malignih staničnih linija *in vitro* uključujući Ehrlichov ascitesni tumor (Middleton, 2000). Kvercetin također ispoljava sinergističke antiproliferativne učinke s cisplatinom na rezistentne leukemijske stanice u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Middleton, 2000).

### 2.1.2. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA FLAVONOIDA

U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidativnog stresa, tj. oštećenja koje slobodni radikali i oksidansi izazivaju na površinskim membranama i receptorima te antioksidativne reparacije.

Uloga antioksidansa je da štite stanicu od štetnih učinaka reaktivnih radikala kisika (engl. *reactive oxygen species*, **ROS**), kao primjerice singletni kisik ( $^1O_2$ ), superoksid ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroksidni radikal-anion ( $O_2^{2-\bullet}$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ), hidroperoksidni radikal ( $HO_2^{\bullet}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), lipidni peroksidni radikali ( $LO_2^{\bullet}$ ), lipidni alkoksilni radikali ( $LO^{\bullet}$ ), a odnedavno se spominje i okolišni (Friedman i sur., 2000) i endogeni ozon (Wentworth i sur., 2001; Wentworth i sur., 2003), i dušika (engl. *reactive nitrogen species*, **RNS**) kao primjerice HOONO, NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> radikali i drugi. Navedene reaktivne vrste kisika i dušika nastaju kao normalna posljedica biokemijskih procesa u tijelu, ali i kao rezultat povećavog

izlaganja okolišnim i/ili prehrambenim ksenobioticima. Općenito, slobodni radikali vrlo su reaktivni i mogu npr. oštetiti lipidnu membranu stvarajući ugljikov radikal koji reagira s kisikom dajući peroksidni radikal koji dalje reagira s masnim kiselinama stvarajući nove ugljikove radikale. Te lančane reakcije daju peroksidacijske produkte lipida (Halliwell, 1994) što znači da pokretanjem lančanih reakcija peroksidacije lipida jedan radikal može oštetiti mnoge molekule. Upravo zbog potencijalno štetne prirode slobodnih radikala u tijelu postoje različiti antioksidativni mehanizmi obrane uključujući enzime, proteine, antioksidanse topive u vodi i u mastima te flavonoide u svojstvu hvatača slobodnih radikala. Izostanak antioksidativne zaštite, tj. neravnoteža između antioksidansa i slobodnih radikala rezultira pojavom oksidativnog stresa koji dovodi do oštećenja stanica zbog djelovanja određenih toksina ili fiziološkim stresom (Halliwell, 1994). Oksidativni stres uključen je u razvojne procese brojnih bolesti, kao što su: astma, alergije, tumori, kardiovaskularne bolesti, katarakta, dijabetes, gastrointestinalne bolesti, bolesti jetre, proširene vene, migrene, makularna degeneracija, periodontalne bolesti i drugi upalni procesi. Također oksidativni stres pridonosi starenju stanica, mutagenezi, karcinogenezi i koronarnim bolestima srca (pojava ateroskleroze) putem destabilizacije membrana, oštećenja DNA i oksidaciji lipoproteina niske gustoće (LDL), ali i neurodegenerativnim bolestima (poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti). Upravo su stoga flavonoidi spojevi koji bi mogli pružiti zaštitu protiv tih bolesti, pri čemu mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina.

Najvažniji je kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala i time prekidaju lančanu reakciju slobodnih radikala. Pri tome da bi flavonoid mogao djelovati kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta:

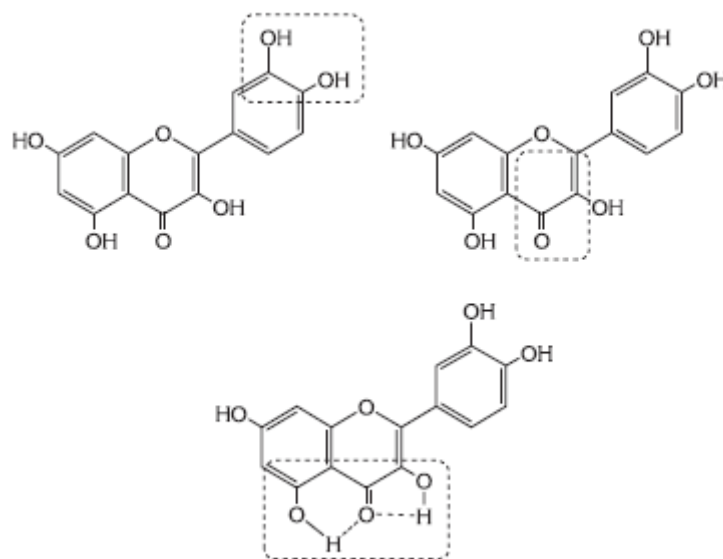
1. kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, mora bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije,
2. iz flavonoida nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju (Halliwell i sur., 1995). Radikali se obično stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom (Shahidi i Wanasundara, 1992).

Glavne strukturne značajke flavonoida važne za sposobnost hvatanja radikala jesu:

1. o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalima i omogućuje delokalizaciju elektrona;
2. 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena,

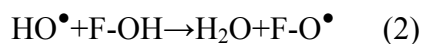
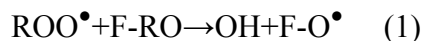
3. hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (Slika 4).

Priznati dijetetski antioksidansi su vitamin C, vitamin E, selen i karotenoidi. Međutim, nedavna istraživanja pokazala su da flavonoidi koji se nalaze u voću i povrću mogu isto tako djelovati kao antioksidansi. Doprinos flavonoida na antioksidativni obrambeni sustav može biti značajan s obzirom da ukupni dnevni unos flavonoida može biti u rasponu od 50-800 mg. Ovaj unos je visok u odnosu na prosječan dnevni unos drugih dijetalnih antioksidansa poput vitamina C (70 mg), vitamina E (7-10 mg) ili karotenoidi (2-3 mg).



**Slika 4.** Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala

Flavonoidi (F) djeluju kao antioksidansi mehanizmom hvatanja slobodnih radikala (Cotelle i sur., 1992; Hanasaki i sur., 1994; Heilmann i sur., 1995; Montensinos i sur., 1995) zbog čega nastaje manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikal (reakcije 1 i 2):



Općenito se vjeruje da se antioksidativno svojstvo flavonoida temelji na njihovoj sposobnosti doniranja vodikova atoma i na taj način hvatanja slobodnih radikala generiranih u reakciji peroksidacije lipida.

Slijedeći mogući način antioksidativnog djelovanja je međureakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, poput vitamina C ili vitamina E ili s antioksidativnim enzimima. Sinergijski učinak međudjelovanja tih antioksidansa vidi se iz primjera povećanja

antiproliferativnog učinka kvercetina u međureakciji s askorbinskom kiselinom. Taj povećani učinak povezan je s mogućnošću askorbinske kiseline da zaštiti polifenol od oksidativne degeneracije (Kandaswami i sur., 1993).

Epidemiološka istraživanja pokazala su da je unos flavonoida obrnuto razmjeran u odnosu na smrtnost od koronarnih bolesti srca i učestalosti srčanog udara. O tome govori ujedno i pojam "francuski paradoks" koji se odnosi na pojavu da u stanovništvu južne Francuske nalazimo manje kardiovaskularnih bolesti premda prehrana, u prosjeku, sadržava veću količinu zasićenih masti negoli je prosječna prehrana stanovništva ostalih razvijenih zemalja. Početna istraživanja tog fenomena pokazuju da konzumiranje umjerene količine alkohola, posebice vina, može smanjiti rizik od bolesti srca i do 40% (Ranaud i sur., 1992). Smatralo se da je sastojak alkohola ili neka druga komponenta crnog vina odgovorna za tu zaštitu. Kasnija istraživanja antioksidativnih djelovanja crnog vina pokazala su da crno vino i izolirani polifenoli crnog vina inhibiraju oksidaciju LDL-kolesterola, prekidajući prvi korak stvaranja aterogeneze (Fuhrman i sur., 1995; Frankel i sur., 1993). Fuhrman i sur. (1995) zabilježili su da i bijelo vino, koje sadržava samo mali dio polifenola karakterističnih za crno vino, zapravo povećava mogućnost izlaganja LDL-oksidaciji, najvjerojatnije zbog mogućnosti da mala količina polifenola prevlada prooksidativna svojstva alkohola. Stoga se pretpostavlja da polifenolni antioksidansi, kao što su flavonoidi u crnom vinu, zajedno s antioksidansima iz maslinovog ulja i svježeg voća i povrća, kojim je bogata mediteranska kuhinja, mogu osigurati zaštitu od koronarnih bolesti srca.

Stanice imunološkog sustava tzv. makrofazi mogu prepoznati i "progutati" oksidirani LDL što dovodi do stvaranja aterosklerotskih plakova u arterijskom zidu. Oksidacija LDL-a može biti potaknuta od strane makrofaga ili uz prisustvo metalnog iona kao katalizatora (npr. bakar). Nekoliko istraživanja su pokazala da neki flavonoidi mogu zaštititi LDL od oksidacije jednim od ta dva navedena mehanizma.

Antioksidativni učinak flavonoida zasniva se na: njihovoj sposobnosti supresije nastanka reaktivnih radikala kisika i dušika inhibicijom enzima ili keliranja elemenata u tragovima (Cu, Fe) koji su uključeni u njihovo nastajanje; sposobnosti sakupljanja ROS i RNS, te aktivaciji i zaštiti antioksidativne obrane organizma (Cheng i Breen, 2000; Middleton i sur., 2000; Russo i sur., 2000; Nijveldt i sur., 2001; Prior, 2003; Galati i O'Brien, 2004; Manach i sur., 2004; Jagetia i sur., 2005; Sobočanec i sur., 2006).

### 2.1.3. IMUNOMODULATORSKA SVOJSTVA FLAVONOIDA

Imunološki sustav ima važnu ulogu u očuvanju homeostaze tijela i to eliminacijom endogeno mutiranih stanica uslijed virusne infekcije ili tumorskih stanica, te egzogenih invazija mikroorganizama. Stoga se sve veća pažnja poklanja mnogim imunomodulatorima kako bi se poboljšao imunološki odgovor samog organizma, budući da su anti-infekcijski lijekovi kao što su antibiotici i antivirusni lijekovi iscrpili svoje terapijske mogućnosti.

Imunomodulatori tj. modifikatori biološkog odgovora (**MBO**) su prirodna ili sintetska sredstva i pripravci koji se rabe u liječenju tumora, a čiji mehanizmi reakcije uključuju modulaciju vlastitog biološkog odgovora jedinke. Oni također otvaraju mogućnost modificiranja odnosa između tumora i njegovog domaćina te mijenjaju odgovor domaćina prema tumoru s pozitivnim učinkom u korist domaćina. U imunomodulatore tako spadaju različiti citotoksini (interferoni, limfokini i monolini), inhibitori rasta tumora, faktori timusa, tumorski antigeni, modifikatori antigena na površini tumorskih stanica, protutijela i stanični elementi protutumorskog odgovora kao i faktori diferencijacije i sazrijevanja stanica (Kujundžić, 1988).

Način djelovanja imunomodulatora je različit. Oni mogu povećati protutumorski odgovor domaćina jačanjem i obnovom protutumorskog djelovanja ili povećati osjetljivost stanica tumora prema endogenim mehanizmima kontrole rasta tumora. Isto tako mogu smanjiti komponente imunološkog odgovora koje suprimiraju protutumorsku reakciju stanica te smanjiti transformaciju i/ili povećati diferencijaciju i sazrijevanje tumorskih stanica (Bevanda, 2006).

Imunomodulacija se stoga može razmotriti kao alternativna metoda u prevenciji i liječenju zaraznih bolesti (Azuma i Jolles, 1987; Hadden i sur., 1989; Toshkov i sur., 1989), ali i neoplastičnih bolesti (Oršolić i Bašić, 2003a; Oršolić i sur., 2004a,b). Mnoge biljke pružaju različite biološke učinke kao što su potencirajuće imunološko djelovanje i antitumorska učinkovitost. Pčelinji propolis i njegove sastavnice najviše su obećavajuća antitumorska (Oršolić i sur., 2003a,b; 2004a,b; 2005a,b,d,e,f) i imunomodulatorska sredstva (Damre i sur., 2003; Oršolić i Bašić, 2003a,b; 2005a,b; Oršolić i sur., 2003b; 2004b; 2005a,b,c). Kimoto i sur. (1998) utvrdili su da artepilin C (sastavnica propolisa) pokazuje citostatske i citotoksične učinke na različite maligne tumorske stanice *in vitro* i *in vivo* putem stimulacije imunološkog sustava, uzrokujući limfocitozu u perifernoj krvi, te aktivaciju i povećanje broja makrofaga i njihove fagocitotične aktivnosti. Pokazalo se da je aktivacija

makrofaga pomoću propolisa i srodnih polifenolnih sastavnica vjerojatno jedan od najvažnijih efektorskih mehanizama antitumorske aktivnosti *in vivo* (Oršolić i Bašić, 2003a; Oršolić i sur., 2005f). Ta otkrića sugeriraju da propolis i njegove sastavnice stimuliraju makrofage i smanjuju broj metastaza karcinoma mliječnih žlijezda u CBA miševa. Rezultati su također pokazali smanjenje obujma tumora te produljenje životnog vijeka sa 14,89% na 40,76% prilikom davanja propolisa i polifenolnih sastavnica prije same inokulacije tumorskih stanica. Imunomodulatorska svojstva propolisa zabilježili su i mnogi drugi autori (Manolova i sur., 1987; Neychev i sur., 1988; Dimov i sur., 1991; 1992). Dokazano je da vodena otopina propolisa stimulira makrofage i pri tome utječe na specifične i nespecifične mehanizme imunološke obrane, prilikom otpuštanja migrirajućih inhibitornih čimbenika, fagocitozom makrofaga, povećanjem broja nastalih rozeta-stanica (engl. *rosette-forming cells*) i stanica koje produciraju protutijela (Bašić i sur., 1998; Oršolić i Bašić, 2003a; Manolova i sur., 1987; Neychev i sur., 1988; Scheller i sur., 1988).

Preliminarna istraživanja su pokazala da vodena otopina propolisa značajno poboljšava dišne funkcije bolesnika astmatičara te da značajno smanjenjuje učestalost njihovih napada (Abd el Hady i Hagazi, 2008). Nedavna otkrića sugeriraju da obrada s vodenom otopinom propolisa u pacijenata astmatičara ima imunomodulatorski učinak na različite postaglandine<sup>1</sup>, leukotriene<sup>2</sup> i citokine što može pomoći u objašnjavanju njihovog terapijskog učinka kao adjuvanske terapije (Abd el Hady i Hagazi, 2008). Životinje izložene  $\gamma$ -zračenju pokazuju pretjerane reakcije na upalne procese kroz generaciju slobodnih radikala koji oštećuju tkiva. Kod njih je ustanovljeno da vodena otopina propolisa inhibira pretjerani upalni odgovor, kao što i inhibira porast lipidne peroksidacije i pojačava aktivnost enzima superoksid dismutaze u izloženih životinja (Abd el Hady i Hagazi, 2008). Osim vodene otopine propolisa i polifenolnih sastavnica, imunomodulatorska svojstva pokazuju i kafeinska kiselina (CA) i fenetil ester kafeinske kiseline (CAPE) (sastavnice propolisa) tako što aktivacija makrofaga dovodi do litičkog procesa tumorskih stanica i inhibicije djelovanja transkripcijskog čimbenika **NF $\kappa$ B** (engl. *nuclear factor kappa B*).

---

<sup>1</sup> Prostaglandini su lipidni metaboliti (hormoni) nastali iz arahidonske kiseline djelovanjem ciklooksigenaze, a spadaju u skupinu sekundarnih upalnih posrednika (medijatora) koji uzrokuju vazodilataciju, agregaciju trombocita i kontrakciju plućnih glatkih mišića.

<sup>2</sup> Leukotrieni ili SRS-A (tvar sporig djelovanja, engl. *slow reacting substance of anaphylaxis*) su lipidni metaboliti (hormoni) nastali iz arahidonske kiseline djelovanjem lipoksigenaze, a spadaju u skupinu sekundarnih upalnih posrednika (medijatora) koji uzrokuju povećanu propusnost krvnih žila i kontrakciju plućnih glatkih mišića. Oba posrednika djeluju autokrano (na istu tu stanicu koja ih i izlučuju, a to su: mastociti, bazofili, trombociti, ali i neke fagocitne stanice kao što su makrofazi, neutrofile i eozinofili) i parakrano (lokalno aktivni, tj. kemotaktički djeluju na druge stanice tj. na neutrofile, bazofile i eozinofile).



Aktivacija makrofaga je važno imunomodulatorsko svojstvo navedenih spojeva jer svojim indirektnim djelovanjem uzrokuju proizvodnju topljivih čimbenika koji reguliraju aktivnost B-i T-limfocita te NK stanica, a izravno iskazuju antitumorski učinak u bliskom doticaju s tumorskim stanicama (Oršolić i Bašić, 2007). Stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se otkrio način i posljedice djelovanja topljivih čimbenika na tumorske stanice proizvedenih od strane makrofaga koji su stimulirani navedenim spojevima.

## **2.2. TUMORI**

Normalni višestanični organizam visoko je socijalno organizirana nakupina stanica u kojoj se održava dinamička ravnoteža između umiranja stanica i njihova obnavljanja. Stanice u organima i tkivima, propale zbog isteka životnoga vijeka, u pravilu se nadomještaju novima iste vrste, tako da ukupan broj i oblik stanica ostaju nepromijenjeni.

Pojavnost stanica koje više ne reagiraju na normalne mehanizme regulacije rasta i koje se neobuzdano, autonomno, nesvrhovito dijele stvarajući besmrtnu potomku značajka je tumorskih stanica koje umnožavanjem stvaraju klinički zamjetljiv **tumor** (lat. *tumor,-oris, m.* - otekline), **neoplazija** (lat. *neoplasia,-ae, f.*, - novotvorenine) ili **blastom** (grč. *blastos, -u, m.* – klica + - sufiks *-oma* koji označava novotvorinu).

Svi tumori, bez obzira na njihovo biološko ponašanje, sastoje se od 2 osnovna dijela:

- ❖ parenhima građenog od pretvorenih ili neoplastičnih stanica po kojem tumor dobiva svoje ime i određuje se njegovo biološko ponašanje te
- ❖ potporne strome građene od vezivnog tkiva, krvnih žila i vjerojatno limfnih žila koja je presudna za rast i razvoj tumora.

Diferencijacija parenhimskih stanica odnosi se na stupanj sličnosti sa stanicama iz kojih potječu, i u morfološkom i u funkcionalnom smislu.

Tumori se po svom biološkom ponašanju dijele u tri glavne skupine:

1. **dobročudni (benigni) tumori** - u pravilu oštro ograničeni na tkiva u kojima se razvijaju, rastu ekspanzivno i ne stvaraju metastaze.
2. **zloćudni (maligni) tumori** - u pravilu neoštro ograničeni, rastu infiltrativno i metastaziraju u okolna tkiva i organe (Francks, 1999). Drugi naziv im je rak (grč. *karkinos,-u, m.*; lat. *cancer,-cri,-ceris, m.* - rak).
3. **graničini (semimaligni/atipično proliferirajući) tumori** - imaju niski zloćudni potencijal i teško je koji puta razlikovati granični tumor od zloćudnog tumora niskog histološkog gradusa (diferencijacija) (Jukić i sur., 2002).

I dobroćudni i zloćudni tumori mogu biti epitelnog i mezenhimalnog podrijetla.

Zloćudni tumori dijele se na:

1. tumore epitelnog podrijetla (90%) tzv. **karcinomi**, i to prema tipu epitela od kojeg su nastali (planocelularni karcinom od pločastog epitela, adenokarcinom od žljezdanog epitela, tranziciocelularni karcinom od prijelaznog epitela, hepatocelularni karcinom iz jetrenih stanica, anaplastični karcinom od nediferenciranih epitelnih stanica),
2. tumore mezenhimalnog podrijetla (mišići, kosti, hrskavice; rijetki u ljudi) tzv. **sarkomi** (grč. *sarx*, -os, f. – meso), a nazivaju se prema vrsti potpornog tkiva s dodatkom riječi sarkoma (npr. liposarkoma, fibrosarkoma, hemangiosarkoma, osteosarkoma, hodrosarkoma, leiomiosarkoma, rabdomiosarkoma itd.),
3. **leukemije** (grč. *leukos*, -u, m. – bijel + grč. *haima*, -atos, n. – krv; lat. *leukaemiae*) i **limfomi** (lat. *lymph*, -ae f. – bistra, čista voda, lat. *lymphoma*) (zloćudne bolesti hematopoetskih sustava i stanica imunosa sustava, čine oko 7%),
4. tumore mozga nastale iz potpornih stanica u mozgu tzv. **gliomi** (ne potječu iz živčanih stanica),
5. tumore podrijetlom iz primitivnih embrionalnih "blastičnih" tkiva karakterističnih za ranu dječju dob tzv. **embrionalni tumori** (npr. nefroblastoma bubrega, neuroblastoma nadbubrežne žlijezde),
6. tumore podrijetlom iz neuroendokrinih stanica, koje imaju sposobnost lučenja polipeptidnih hormona ili aktivnih amina tzv. **neuroendokrini tumori** (npr. medularni karcinom štitne žlijezde) (Kumar i sur. 2000; Jukić i sur., 2002).

Benigni tumori dijele se na:

1. tumore epitelnog podrijetla koji se nazivaju prema vrsti epitela od kojeg su nastali s dodatkom nastavka **-oma** (npr. adenoma, papiloma, cistadenoma, itd.)
2. tumore mezenhimalnog podrijetla koji se nazivaju prema vrsti potpornog tkiva od kojeg su nastali s nastavkom **-oma** (npr. fibroma, lipoma, hemangioma, osteoma, hondroma, leiomioma).

Ljudski tumori su monoklonalnog (unicelularnog) podrijetla, što znači da su nastali od jedne transformirane stanice, što potvrđuju i dokazi da se u klonu svih stanica iste vrste tumora mogu naći zajednički biljezi (markeri/antigeni). Nastanak tumora uzrokuju promjene u genima tj. mutacije u DNA, koje mogu biti stečene ili nasljedne, dajući stanicama nove biološke osobine, tj. maligni fenotip. Budući da su tumorske stanice genetski nestabilne, one su stoga podložne mnogim dodatnim mutacijama tijekom rasta od kojih mnoge mogu biti letalne; neke mogu uzrokovati smanjen rast u odnosu na susjedne stanice, pa se takvi

supklonovi izgube iz populacije stanica tumora, dok neke pak pridonose većoj autonomiji i prednosti u rastu pa predstavljaju dominantne maligne supklonove koji vode prema progresiji tumora.

**Tablica 1. Usporedba benignih i malignih tumora**

OBILJEŽJA	BENIGNI TUMORI	MALIGNI TUMORI
DIFERENCIJACIJA <sup>3</sup> - ANAPLAZIJA <sup>4</sup>	dobro diferencirani; građa može biti tipična za tkivo od kojeg potječe, prisutnost čahure	određeni manjak diferencijacije s anaplazijom; građa je često atipična, prisutnost pseudočahure
BRZINA RASTA	obično raste stalno i polagano; može ući u stadij mirovanja ili nazadovanja; mitoze su rijetke i normalne	nepravilna, može biti i polagana i brza; mitoze mogu biti brojne i abnormalne
LOKALNA INVAZIJA	obično su kohezivne, dobro ograničene mase koje rastu ekspanzivno i ne infiltriraju okolna normalna tkiva	lokalno su invazivni, infiltriraju okolna tkiva; katkad mogu izgledati kohezivno i ekspanzivno
METASTAZE	nema	često prisutne; što je primarni tumor veći i manje diferenciran, prisutnost metastaza je vjerojatnija

Iako svi supklonovi mogu posjedovati zajedničke biljege koje mogu biti zajednički i normalnim proliferirajućim stanicama mnogi imaju i nove osobine koje vode do heterogenosti što uključuje morfologiju, proliferaciju, kariotip, površinske biljege, biokemijske proizvode, metastaziranje i osjetljivost na terapiju.

Tijekom rasta tumora najmanje su 3 mehanizma odgovorna za heterogenost, a to su:

- a) različita mogućnost prehrane zbog ograničenog rasta krvnih žila u rastućem tumoru, a očituje se smrću stanica i nekrozom,
- b) nastanak novih klonova tijekom progresije tumora i
- c) diferencijacija tumorskih stanica unutar jednog klona (Ban i Osmak, 2006).

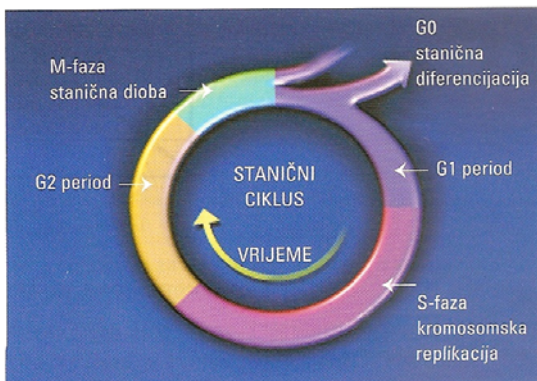
<sup>3</sup> Diferencijacija znači u kojoj mjeri morfološki i funkcionalno parenhimske stanice nalikuju uspoređivanim normalnim stanicama.

<sup>4</sup> Anaplazija je gubitak strukturne i funkcionalne diferencijacije tj. dediferencijacija malignih stanica i najteži je poremećaj staničnog rasta.

Dobro diferencirani tumori kao što su dobroćudni tumori građeni su od stanica koje su nalik na zrele normalne stanice tkiva ili organa u kojima se tumor razvio te mogu proizvoditi hormone i enzime, kao i normalne stanice iz kojih se tumori razvijaju. Slabo diferencirani (nezreli) ili nediferencirani tumori imaju stanice primitivnog izgleda, morfološki i funkcionalno nespecijalizirane, te ih stoga nazivamo anaplastičnim tumorima; značajka su zloćudnih tumora (Jukić i sur., 2002). Anaplastične stanice mogu iskazivati znatne razlike u veličini cijelih stanica i jezgara, što se označava izrazom pleomorfizam. Nediferencirani tumori u usporedbi s dobro diferenciranim tumorima u pravilu imaju veći broj mitoza, kao znak povećane proliferirajuće aktivnosti parenhimskih tumorskih stanica (Jukić i sur., 2002). Tumorske stanice pritom iskorištavaju velike količine glukoze kao izvor energije da bi omogućile pojačanu sintezu nukleinskih kiselina iz nukleotida i aminokiselina. Takav metabolizam i procesi koji se pri tome zbivaju nije specifičan za tumorska tkiva jer se pojavljuje i u normalnim fetalnim i regulacijskim tkivima te u hematopoetskim tkivima (matične stanice koštane srži, stroma endometrija), sluznici probavnog sustava (stanice žljezdanog epitela) i folikulima dlaka. Za tumorske stanice specifičan je poremećaj (deregulacija) staničnog ciklusa, njihova nesposobnost da zaustave ekspresiju pojedinih gena i stanični ciklus ili omoguće tok procesa programiranog odumiranja – apoptoze te na taj način zaustavi umnažanje stanica i rast tumora (Tomak, 2000).

Također tumori zadržavaju i ograničen broj matičnih stanica koje mogu obnoviti tumor.

Tumorsko tkivo, u usporedbi sa zdravim, prekomjerno proliferira i proizvodi potomke, dok je diferencijacija gotovo zaustavljena. Pri tome se transformirane matične stanice dijele beskonačno, ali ne brže od zdravih stanica, pa se masa tumora povećava zbog velikog broja proliferirajućih malignih stanica. Da bi se tumor mogao opaziti fizikalnim ili radiološkim pretragama, treba imati određeni broj stanica koji za površinske tumore iznosi



**Slika 5.** Faze staničnog ciklusa

$10^8$ - $10^9$  stanica promjera 1 cm (1 g tumorske mase), a veći je za tumore smještene dublje, pri čemu je do tada prošlo 30 dioba stanica. Daljnji rast tumora nije više eksponencijalan jer se sve veći broj stanica tumora nalazi u fazi mirovanja (G0 fazi) ili odumre i definitivno izlazi iz diobe (Slika 5).

U daljnjih 10 dioba tumor će dosegnuti broj od oko  $10^{12}$  stanica i tumorsku masu od 1 kg što u većine bolesnika izaziva smrt. Veća tumorska masa obično dovodi i do smetnji u funkciji organa u kojem je tumor smješten ili u funkciji susjednih organa na koje tumor vrši pritisak (Tomek, 2000).

Zloćudni tumori mogu također biti odgovorni za kaheksiju<sup>5</sup> (iscrpljenje) ili paraneoplastične sindrome<sup>6</sup>. Predispoziciju za rak stvaraju naslijeđene genetske mutacije, koje, same po sebi, nisu uzrokom maligne pretvorbe, ali će to svojstvo steći kada se u tijeku života akumuliraju dodatne somatske mutacije koje dopuštaju očitovanje malignog fenotipa (Nagy, 1996). Većina tumora je stoga posljedica brojnih okolišnih karcinogena, koji, zajedno sa stečenim i naslijeđenim mutacijama, na različitim razinama pridonose deregulaciji ključnih staničnih funkcija.

Karcinogeneza je stoga proces niza promjena na fenotipskoj i na genotipskoj razini koji završava nastajanjem tumora. Može biti potaknuta brojnim endogenim i egzogenim uzorcima koji uvjetuju gensko oštećenje stanice. Većina karcinogena ima osobinu elektrofila koji su zbog vezanja na nukleinsku kiselinu genotoksični pa ih nazivamo reaktivnim karcinogenima, za razliku od nereaktivnih (epigenetskih) karcinogena (poput saharina) koji se izlučuju nepromijenjeni i ne prolaze nikakvu aktivaciju, a ipak povećavaju učestalost raka u obrađenih životinja (Nagy, 1996).

Normalne i zloćudno promijenjene stanice mogu se uzgojiti u kulturi. Postoje 4 vrste karcinogenih agensa koje uzrokuju genetsko oštećenje, a to su kemijski karcinogeni, fizikalni karcinogeni tj. zračenje (ultraljubičasto, X- i gama zračenje), onkogeni (DNA ili RNA) virusi i DNA iz tumorskih stanica koji mogu djelovati odvojeno, zajedno ili u nizu i tako uzrokovati višestruke genetske nenormalnosti karakteristične za neoplastične stanice u kulturi stanica. Osobine promijenjenih stanica uključuju gubitak kontaktne inhibicije rasta, nagomilavanje stanica i tvorbe metastatskih fokusa, gubitak ovisnosti o prihvaćanju za podlogu i smanjenu potrebu za serumom. Rast stanica u kulturi ovisi o prisutnosti čimbenika rasta. Kulture stanica su pogodni modelni sustavi za testiranje protutumorskih lijekova; za predviđanje uspješnosti terapije; za izučavanje molekularnih mehanizama kojima tumorske stanice postaju otporne na terapiju; za istraživanje tvari koje mogu smanjiti otpornost na kemoterapeutike itd. (Ban i Osmak, 1996).

---

<sup>5</sup> Kaheksija je iscrpljujući sindrom obilježen smanjenjem udjela masti u organizmu i ukupne tjelesne mase, a očituje se izrazitom slabošću, gubitkom teka i anemijom. Smatra se da nastaje zbog djelovanja različitih citokina koje luče tumorske stanice.

<sup>6</sup> Kompleksni sindromi koji se ne mogu objasniti kaheksijom, lokalnim ili udaljenim širenjem tumora, proizvodnjom hormona, a pojavljuju se u otprilike 10% bolesnika sa zloćudnim bolestima i mogu biti prvi znak neke skrivene novotvorine.

### *2.2.1. RAST TUMORSKOG ČVORA*

Da bi se razvila klinička slika tumorske bolesti, nije dovoljna samo pojava zloćudne stanice. Naime, jednom stvorena zloćudna stanica mora pronaći pogodan okoliš za razvoj u tumorski čvor. "Uspavane" tumorske stanice mogu u tijelu opstati i desetljećima prije nego organiziraju svoju prokrvljenost i izraze svoj maligni fenotip.

#### *2.2.1.1. Tumorska angiogeneza*

Da bi nakupina tumorskih stanica u tkivu, u obliku kuglice promjera 1 – 2 mm, mogla dalje rasti, nužno je da organizira vlastitu prokrvljenost. Sposobnost pokretanja angiogeneze je biološka potreba povezana sa zloćudnošću, jer bez pristupa krvnim žilama tumor ne bi mogao metastazirati. Ta nakupina tumorskih stanica obavlja izmjenu tvari s okolišem (normalnog tkiva) jednostavnom difuzijom, koja je dostatna samo za sloj stanica blizu površine kuglice, dok one u središtu nekrotiziraju. Stanice se neprestano rađaju, "putuju" u unutrašnjost i umiru. Proces angiogeneze započne razgradnjom bazalne mebrane oko endotelnih stanica (kapilara), zatim promjenom oblika endotelnih stanica u susjedstvu te bazalne membrane i njihovim prodorom u susjednu stromu. Endotelne stanice u fronti prodora proliferiraju čime se zapravo dubina prodora povećava. Stanice iza fronte prodora prestaju proliferirati, poprimaju uobičajeni oblik endotelnih stanica, započinju blisko prilijegati jedne uz druge s formiranjem lumena. Dolazi i do spajanja "fronti prodora" tako da nastaju "petlje" novih kapilara, što omogućuje cirkulaciju kroz novoprokrvljenu regiju. U odraslih jedinki proces angiogeneze je relativno rijedak, odnosno javlja se, primjerice, u endometriju žena tijekom reproduktivnih ciklusa, zatim kod cijeljenja rana i kod rasta tumora (Juretić, 2000). Endotelne stanice pripadaju među najdulje živeće stanice. Izuzimajući regije s procesom angiogeneze, procjenjuje se da se u diobi nalazi samo jedna od 10 000 endotelnih stanica. U skladu s time, zamjena (obnova) endotelnih stanica unutar krvnih žila može trajati godinama, za razliku npr. od stanica crijevnog epitela gdje se proces obnove dogodi unutar desetak dana (Juretić, 2000). Iako sve imaju zajedničkog pretka, ipak su one genetski nestabilne i vrlo heterogene po svojim svojstvima, kao što su: veličina, oblik, brzina rasta, kariotip, antigeničnost, imunogeničnost, osjetljivost na vanjske utjecaje, osjetljivost na citotoksične lijekove, proizvodnja pigmenata i hormona, kakvoća i broj receptora na površini stanične opne, metastatski potencijal i dr. (Bašići sur., 1996.; Taradi, 2004). Upravo ta genska nestabilnost, koja traje tijekom čitavoga života tumora, jest osnovni problem terapijskoga

pristupa tumorima. Kad neke tumorske stanice zadobiju svojstvo lučenja čimbenika tumorske angiogeneze (engl. *tumour angiogenesis factor*, **TAF**), on stimulira urastanje novih domaćinovitih kapilara u tumor koje osiguravaju potrebne hranjive tvari i kisik. Na urastanje krvožilja utječu slijedeći čimbenici rasta: **VEGF** ili **VPF** (engl. *vascular endothelial growth factor* ili *vascular permeability factor*), **FGF** (engl. *fibroblast growth factor*), **TGF- $\beta$**  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ), **TNF- $\alpha$**  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) itd. (Juretić, 2000; Jukić i sur., 2002). Tada tumor raste "agresivno", infiltrirajući i destruirajući okolno zdravo tkivo (Taradi, 2004).

Angiogeni čimbenici združeni s tumorom mogu se razvrstati u dvije skupine:

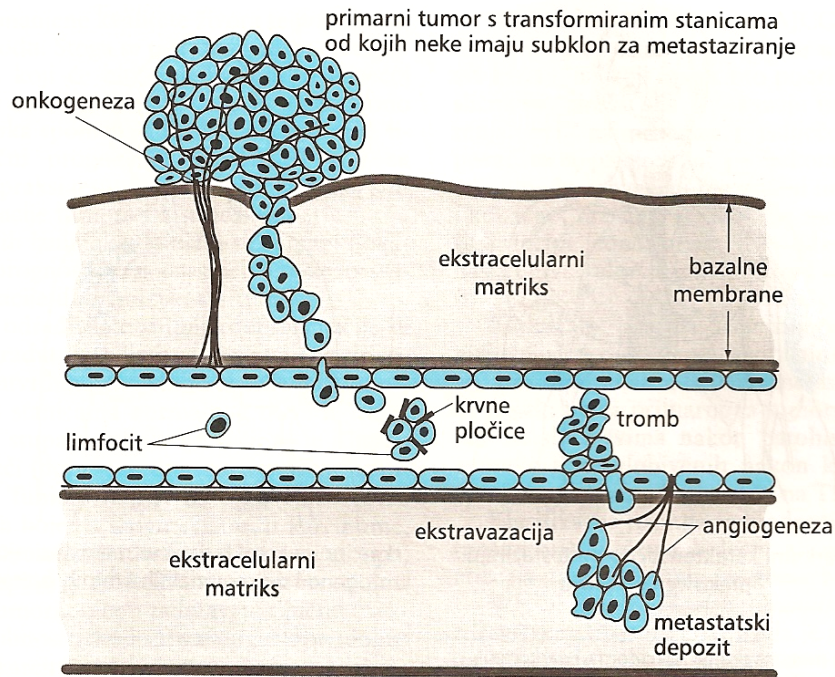
- one koje proizvode tumorske stanice
- one koji potječu od upalnih stanica (npr. makrofaga) koje infiltriraju tumore (Kumar i sur., 2000).

Stvoreni sustav krvnog i limfnog protoka ubrzava rast tumora, struje obaju tjelesnih tekućina omogućuju ili olakšavaju otkinutim djelićima tumorskog tkiva ili pak embolima tumorskih stanica odvod u sustavnu cirkulaciju i limfotok, vjeruje se najčešće (zbog tanke stijenke) u području venula i malih limfnih žila. Stoga se intezitet angiogeneze (gustoća krvnih žila u tumoru) može upotrijebiti kao čimbenik prognoze u smislu procjene malignosti i metastazibilnosti tumora (Juretić, 2000).

### 2.2.1.2. Metastaziranje

S vremenom mnogi tumori postaju agresivniji i stječu veću zloćudnu snagu što nazivamo tumorskim napredovanjem ili progresijom. Invazija u izvanstanična tkiva aktivan je proces koji se može podijeliti u 3 koraka:

- pričvršćivanje tumorskih stanica za sastojke tkiva (bazalna membrana) pomoću receptora za laminin, fibronektin, kolagen i dr. glikoproteini,
- lokalna razgradnja (liza) izvanstaničnog tkiva (2-8 sati nakon vezanja za receptor) tj. bazalne membrane i intersticijskoga vezivnog tkiva proteolitičkim enzimima (kolagenaze tipa IV, plazminogen aktivator i elastaze) koje izlučuju same tumorske stanice ili normalne stanice pod utjecajem tumorskih stanica te omogućuju prolazak kroz kapilarnu stijenku,
- seoba tumorskih stanica.



**Slika 6.** Stupnjevi hematogenog metastaziranja zloćudnih tumora

Naziv metastaziranje (grč. *metastasis -eos, f. -premjestanje, promjena*) označuje razvoj sekundarnih presadnica (metastaza) koji nisu u dodiru s primarnim tumorom. Pri tome svi maligni tumori mogu metastazirati, tj. dio stanica može se otkinuti od primarnog tumora, otputovati na udaljeno mjesto i tamo nastaviti rasti. Metastaze mogu biti regionalne (lokalne), udaljene, a ako su razasute po čitavu tijelu, govorimo o generaliziranim metastazama. U svakom stupnju upleću se obrambeni mehanizmi domaćina (imunološki, hormonski, čimbenici zgrušavanja) i mehanički čimbenici, koji mogu uništiti tumorsku stanicu. "Nespecifični" mehanizmi obrane, primjerice makrofagi i stanice ubojice (NK stanice), mogu biti snažni razarači heterogenih populacija tumorskih stanica; njihova je uloga vjerojatno najvažnija baš u uklanjanju i razaranju tumorskih stanica i u optoku i u uspostavljenim mikrometastazama (Bašić i sur., 1996). Maligni tumori mogu se širiti na 4 načina:

- a) usađivanjem (implantacijom) unutar prirodnih tjelesnih šupljina ili površina,
- b) limfogeno tj. preko limfnih žila koje je tipičnije za karcinome,
- c) hematogeno tj. embolizacijom kroz krvne žile koje je češće za sarkome i
- d) transplantacijom obično mehaničkim instrumentima ili rukavicama tijekom kirurškog zahvata, najčešće u rubove rane.

Prije samog prodora tumorskih stanica kroz bazalnu membranu gube se međustanične veze i dolazi do razdvajanja stanica bilo pojedinačno bilo u skupinama koje



zatim prijanjaju uz bazalnu membranu, infiltriraju je i prodiru kroz nju. Do razdvajanja dolazi zbog toga što su kohezivne veze između zloćudnih stanica labave, zbog proteolitičkih enzima koji pokušavaju odvojiti nekrotične dijelove tumora od ostaloga dijela te zbog toga što zloćudne stanice iskazuju svojstvo pokretljivosti, odnosno ameboidnog kretanja. To su i razlozi zbog kojih se zloćudne tumore ne smije masirati. Stanice koje su prošle kroz bazalnu membranu prodiru i invadiraju međustanični matriks, gdje prodiru do stijenke krvnih žila. Invazija je aktivan proces kojem neposredno prethodi degradacija intracelularnog matriksa uz potporu proteolitičkih enzima iz tumorskih stanica, prije svega proteaza (serin, cistein, kolagenaza za kolagen tipa IV koji je sastavni dio bazalne membrane). Slijedi invazija stijenke krvne žile i prodor u krvotok tako što tumorska stanica dotakne perivaskularnu membranu, zakvači se za nju uz pomoć lamininskih receptora i počne lučiti kolagenazu tipa IV, koja je specifična za kolagen u bazalnoj membrani (Jukić i sur., 2002).

Krv nije osobito povoljan okoliš tumorskim stanicama jer je njihovo oštećenje u krvotoku jedan od čimbenika neuspješnosti metastatskog rasta. Tijek krvi u arterijama je brz i u njemu su mnoge pogibi za tumorske stanice, koje se pretežno očituju mehaničkim oštećenjem tumorskih stanica (Bašić i sur.; 1996).

U krvnoj struji ili okolišu tumora samo neke tumorske stanice stvaraju embrole nakupljanjem i pričvršćivanjem za leukocite (limfocite) u krvi ili trombocite, kao i interakcija s hemostatskim molekulama (depoziti fibrina) te na taj način budu donekle zaštićene od djelovanja antitumorskih stanica domaćina i imaju veću mogućnost preživljenja i stvaranja metastaza (Bašić i sur., 1996; Juretić, 2000; Taradi, 2004). Postoje također opažanja da tumorske stanice mogu biti i aktivne u smislu sinteze prokoagulantnih molekula. Klinički se to može izražavati u smislu povećane koagulabilnosti u bolesnika s tumorima (Juretić, 2000). Međutim, većina tumorskih stanica se u krvnoj struji nalazi pojedinačno i to prodorom kroz novonastale i nepotpune ili već postojeće krvne žile.

Budući da tumorima općenito nedostaje dobro razgranata mreža limfožilja, tumorske stanice mogu ulaziti u limfotok samo u izvanjskim dijelovima tumora, ali ne i u njegovoj unutrašnjosti. Tumorske stanice koje uđu u limfotok odlaze do područnih limfnih čvorova, gdje se 10-60 minuta zaustave u supkapsularnim sinusima odakle opet znatna količina stanica odlazi u eferentne (odvodene) limfne žile koje su povezane sa venskim optokom krvi zahvaljujući mnoštvu limfno-krvožilnih spajanja. Izlaženje (ekstravazacija) iz krvne žile slobodnih tumorskih stanica ili tumorskih embola uključuje međusobno pričvršćivanje za endotel krvne žile, što ovisi djelomično o specifičnosti prijanjanja tumorske i endotelne stanice u različitim tkivima. Adhezija (vezanje za integrinske i neintegrinske receptore) i

ekstravazacija tumorskih stanica može biti olakšana i postojanjem ili stvaranjem fibrinskih ugrušaka na mjestu njihove adherencije (Juretić, 2000). Nakon priljepljivanja na stanice endotela tumorske stanice pseudopodijima ulaze u prostore među endotelnim stanicama, izazivajući na taj način skupljanje endotelnih stanica, što oslobađa pristup tumorske stanice bazalnoj membrani, na koju se ova veže pomoću laminina (Bašić i sur., 1996) nakon čega slijedi izlazak kroz bazalnu membranu mehanizmima sličnim onima koji djeluju pri invaziji. Nakon udomljenja u intersticijskom prostoru tumorska se stanica može dijeliti, osnivajući tako koloniju stanica-metastaza koja ponovno može biti nositeljem novog procesa stvaranja metastaza, uvećavajući na taj način razinu rasapa malignih stanica.

Mjesto izlaska iz krvne žile, a prema tome i organ gdje nastaje metastaza, može se općenito predvidjeti na osnovi lokalizacije primarnog tumora i području otjecanja krvnog ili limfnog sustava. Međutim, u mnogim slučajevima prirodni putevi otjecanja ne objašnjavaju prikladno raspored metastaza. Na migraciju (kapacitet i smjer) utječu razni solubilni čimbenici (citokni). Neke mogu lučiti same tumorske stanice (autokrini regulacija), dok drugi mogu potjecati od susjednih ili udaljenih normalnih stanica (Juretić, 2000). Metastaze obično imaju kraće vrijeme udvostručenja obujma nego primarni tumori od kojih potječu, a vrijeme udvostručenja metastaza također ovisi i o tipu tkiva na kojem nastaju (Tomek, 2000). U trenutku početka liječenja metastatske bolesti može se pretpostaviti da je broj zloćudnih stanica u organizmu  $10^{10}$  do  $10^{11}$ .

Sklonost stvaranja metastaza na organima može biti povezana sa slijedeća 3 mehanizma:

1. Tumorske stanice koje se pričvršćuju za endotel mogu imati molekule za pričvršćenje čije molekule pokazuju posebnu sklonost za endotelne stanice ciljanog organa.
2. Neki ciljani organi mogu oslobađati tvari (čimbenika rasta ili hormona) koje imaju sklonost kemijskog privlačenja tumorskih stanica na određeno mjesto.
3. U nekim slučajevima ciljano tkivo može biti neprimljivi okoliš za rast tumorskih stanica.

Dakle, organ u kojemu se utemeljuju metastaze jest specifičan za određeni tumor. Kod metastaziranja u prednosti su one tumorske stanice koje imunski sustav ne prepoznaje kao strane (Juretić, 2000). Međutim, zaustavljanje žive metastatske stanice u nekom tkivu nije jamac nastanku metastaze. Pokusi su tako, primjerice, pokazali da manje od 0,1% tumorskih stanica ubrizganih u cirkulaciju preživi, odnosno formira metastatske kolonije (Juretić, 2000).

Smatra se da su za to odgovorni turbulencija (vrtložno gibanje) krvi, relativno niska deformabilnost (preživljavanje u mikrocirkulaciji) tumorskih stanica i njihovo liziranje od

strane endotelnih stanica (Juretić, 2000). Klinička i pokusna istraživanja otkrivaju da je povećana zloćudnost (npr. ubrzani rast, invazivnost i sposobnost stvaranja udaljenih metastaza) često stečena u napredujućem obliku. Poznato je da lokalizirano oštećenje tkiva, traumatizacijom, zračenjem ili citostaticima povećava metastaze u njemu, što je ujedno i potvrda da okoliš u organu utječe na rast metastaza tumora (Bašić i sur., 1996).

Skup kliničkih podataka ukazuje na vjerodostojnost postojanja "mirujućih" metastaza (engl. *dormant metastasis*) za koje postoje 3 moguća mehanizma objašnjenja:

- a) imunološko obuzdavanje, prema kojem je smrtnost tumorskih stanica jednaka njihovom rastu,
- b) stalna ovisnost tumorskih stanica o čimbenicima rasta domaćina i
- c) nedostatak krvožilja, koji ograničavaju veličinu metastaze zbog difuzijom ograničene prehrane (Bašić i sur., 1996).

Na molekularnoj razini, tumorsko napredovanje i združena različitost najvjerojatnije su posljedica višestrukih mutacija zbog genetske nestabilnosti pretvorenih stanica koje se neovisno nakupljaju u različitim stanicama, stvarajući tako supklonove različitih obilježja. Molekularni mehanizmi koji tumorskim stanicama omogućavaju metastaziranje nalaze se i tijekom raznih fizioloških i netumorskih stanja, primjerice, za vrijeme implatacije trofoblasta, u embrionalnoj morfogenezi, remodeliranju tkiva, upalama, zacjeljivanju rana itd. (Juretić, 2000).

Za sada nije pronađen ni jedan "gen za metastaziranje". Budući da metastatske stanice moraju steći višestruka svojstva (npr. stvaranje receptora tj. primače za pričvršćivanje, proizvodnja kolagenaza, čimbenici pokretljivosti), neki smatraju da nije vjerojatno da jedna genetska promjena stvara stanice sklone metastaziranju. Unatoč tome, pojavila se uzajamna povezanost između razine izražavanja tumor-supresor gena nm 23 (prema engl. *nonmetastatic 23*, uzročnika karcinoma dojke) kao kandidata i sposobnosti metastaziranja. Naime u mišjim modelima izražavanje gena nm 23 je jako u linijama životinja sa slabom sposobnošću metastaziranja, a smanjeno je 10 puta u linijama s jakom metastatskom sposobnošću što je kasnije utvrđeno i na studijama u ljudi (Juretić, 2000; Kumar i sur., 2000). Također, rezultati su pokazali da nm 23 može biti jedan od dobrih pokazatelja prognoze karcinoma pločastih stanica vrata maternice. Fiziološka uloga proteina nm 23 nije sasvim jasna, izgleda da ima enzimsku aktivnost, odnosno da se radi o nukleozid difosfat kinazi. Ti enzimi kataliziraju prijenos anorganske fosfatne grupe na razne proteine, a što je u svezi s regulacijom signala od

čimbenika rasta i sinteze/razgradnje mikrotubula (molekule važne za diobu stanica i pokretljivost) (Juretić, 2000).

### **2.2.2. MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORA**

Sve tumorske stanice u jednom tumorskom čvoru su potekle od jedne jedine stanice čiji je nastanak obično dugotrajan, postupni proces nagomilavanja niza genetskih promjena tj. mutacijom specifičnih dijelova genoma koji su odgovorni za reprodukciju ili rast stanica. Te mutacije za regulaciju rasta mijenjaju količinu ili svojstva proteina koje kodiraju, a koje remete nadzor nad staničnim dijeljenjem.

Istraživanje i utvrđivanje genetskog oštećenja u tumorskim stanicama danas zauzima središnje mjesto u istraživanju malignih bolesti. Ta su oštećenja, najčešće recesivne i dominantne mutacije, veliki rearanžmani DNA i točkaste mutacije, značajna za brojne maligne tumore ljudi i životinja, a pridonose drastičnim promjenama u ispoljavanju određenih gena i/ili promjenama njihovih biokemijskih funkcija.

Analize oštećenja genoma u tumorskim stanicama upozorile su na postojanje skupine gena za koje se drži da sudjeluju u nastanku i progresiji tumora. Skupina tih gena sastavni je dio genoma svake eukariotske stanice te u normalnim okolnostima sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa i diferencijaciji, a to su:

#### **1. ONKOGENI**

Onkogeni su mutirani (aktivirani) oblici normalnih gena tzv. protoonkogeni koji su nastali retrovirusnom pretvorbom (transdukcijom/transfekcijom virusni onkogeni ili *v-onci*) ili utjecajima koji mijenjaju (oštećuju) ponašanje protoonkogeni *in situ*, mijenjajući ih tako u stanične onkogene (celularni, *c-onci*), a čiji proizvodi (onkoproteini) potiču stanični rast i razvoj novotvorina tj. zloćudnu preobrazbu stanice jer često im nedostaju nadzorni elementi tj. dijelovi koji nadziru "uključenje" i "isključenje" onkogeni. Također, proizvodnju samih onkogeni u tumorskim stanicama nije potrebno poticati različitim čimbenicima rasta ili vanjskim utjecajima, budući da su onkogeni u tumorskim stanicama stalno "potaknuti" (Jukić i sur., 2002). Smatra se kako su, zbog pogrešnog prepisivanja, stanični onkogeni preuzeti od virusa tijekom svoga razvoja (Jukić i sur., 2002). Prema tome, onkogeni su funkcionalno ili strukturno promijenjeni protoonkogeni. Mnogi protoonkogeni kodiraju proteine (koji mogu biti faktori rasta, receptori faktora rasta,

enzimi, proteini koji vežu DNA ili transkripcijski faktori) koji su karike u lancu reakcija kojima se prenose signali rasta od površine do duboko u unutrašnjost stanice te sa tumor-supresor genima imaju ključnu ulogu u normalnoj kontroli mitoze tj. stanične proliferacije i diferencijacije. Različiti su biološki putovi aktivacije onkogeni, a uključuju: a) povećanje broja kopija onkogeni u genomu tumorske stanice, b) mutaciju (najčešće točkaste mutacije) u kodnom odjeljku onkogeni, c) lomove kromosoma i translokaciju (premještanje dijelova kromosoma i spajanje s drugim) s posljedičnim pospješenjem izražajnosti onkogenom kodiranog proteina i d) ugradnja retroviralnog promotora u blizini protoonkogeni tzv. amplifikacija koja označava prekomjernu aktivnost nekog gena. Za njihovo otkriće zaslužni su J. Michael Bishop i Harold Varmus koji su 1989. godine dobili i Nobelovu nagradu.

## **2. TUMOR-SUPRESOR GENI**

Za razliku od onkogeni, kojih aktivacija ili pojava u stanici transfekcijom izaziva zloćudnu preobrazbu, tumor-supresor geni djeluju suprotno: njihov gubitak, mutacija ili inaktivacija rezultirat će zloćudnom preobrazbom stanice. Mnogi su tumori posljedica nedostatka ili pogrešne funkcije i/ili strukture regulacijskih proteina kodiranih tim tumor-supresor genima (antionkogeni) koji inače u normalnim stanicama obuzdavaju rast i potiskuju diobu stanica tj. sprečavaju neprikladne ili prekomjerne stanične proliferacije pa se stoga nazivaju i negativnim regulatorima stanične proliferacije, a ujedno sudjeluju i u nadzoru popravka oštećenja DNA. Ovi geni imaju važnu funkciju i u diferencijaciji stanica tako što koče stanični ciklus, što je nužan preduvjet diferencijacije (Pavelić, 2000). Dokazano je da postoji kompetitivno djelovanje između nekih onkogeni i tumor-supresor gena te njihovih kodiranih proteina uključenih u procese koji uzrokuju gubitak kontrole proliferacije stanica raka. Promijenjeni protoonkogeni i tumor-supresor geni mogu uslijed mutacija ili preraspodijele kromosoma uzrokovati nekontroliranu diobu stanica.

### 3. GENI ZA POPRAVAK I PROVJERU DNA

To su geni koji provjeravaju i održavaju ispravnost molekule DNA koja se tijekom udvostručavanja često narušava. Osim gena to mogu biti i nadzorni proteini koji zaustavljaju slijedeću fazu dijeljenja, ako se molekula DNA nije ispravno udvostručila tako što mogu zaustaviti ili potaknuti programiranu smrt stanice, tj. apoptozu (Taradi, 2004).

Da bi stanica postala maligna, mora doći do mutacija prosječno u 6 ili više gena koji nadziru rast stanice. U većine ljudskih tumora pronađene su mutacije u jednoj ili nekoliko skupina tih gena. Radi se o gomilanju najprije definiranih i karakterističnih mutacija gena povezanih s tumorima, zatim o točkastim mutacijama drugih gena, o aktiviranju onkogeni i njihovim mutacijama, o ektopičnom izražavanju inače normalnih gena, te o inaktivaciji supresijskih tumorskih gena.

#### 2.2.3. IMUNOSNO PREPOZNAVANJE TUMORSKE STANICE

T i B limfociti su jedine imunosne stanice koje imaju specifične receptore za antigen, pa stoga samo oni mogu specifično prepoznati i reagirati na neki antigen. Među T limfocitima dvije subpopulacije stanica mogu istodobno reagirati na antigen: limfociti koji iskazuju molekulu CD4 (limfociti CD4<sup>+</sup>) i limfociti koji iskazuju molekulu CD8 (limfociti CD8<sup>+</sup>), premda često dominira reakcija jedne ili druge subpopulacije.

Osim što imaju drugačije građene receptore za antigen, T i B limfociti prepoznaju antigen na različit način. B limfociti u načelu prepoznaju slobodan (topljiv) antigen koji se izravno veže na njihove receptore, dok T limfociti ne mogu prepoznati slobodan antigen nego samo antigen koji je predočen (prezentiran) na membrani drugih stanica. Nadalje, T limfociti ne prepoznaju intaktni proteinski antigen, nego peptid(e) koji nastaju razgradnjom tog antigena u stanici koja ga predočuje i to samo ako je on izložen (prezentiran) na membrani zajedno s vlastitim antigenima glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, **MHC**). Ustvari T limfocit uvijek prepoznaje kompleks između vlastitih molekula MHC i tuđeg antigena, pri čemu receptor T limfocita veže molekulu MHC i mali antigenski peptid smješten u brazdi te molekule.

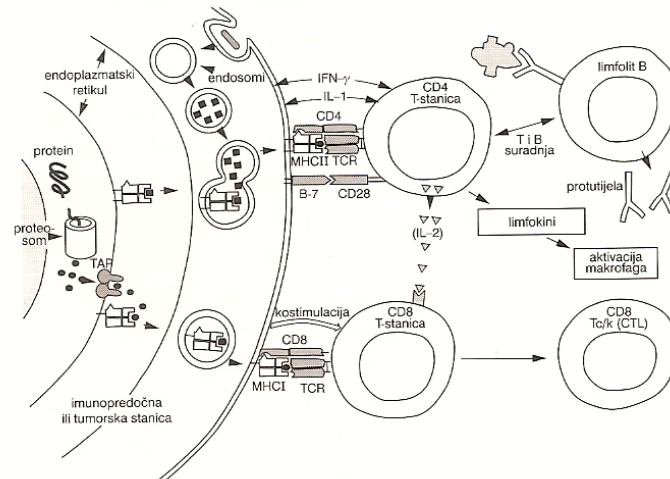
Važno je istaknuti da je prepoznavanje T limfocitima MHC-spregnuto (tzv. MHC-restrikcija), jer T limfociti u sekundarnoj reakciji neće prepoznati i reagirati na neku drugu stanicu koja ima isti antigen, ali drugačiji MHC od stanice koja je prezentirala antigen u

primarnoj reakciji. Dvije vrste gena MHC kodiraju proizvodnju dviju vrsta proteinskih molekula na površini stanica-molekule razreda I MHC (MHC I) i molekule razreda II (MHC II), koje su vrlo polimorfne, tj. građa im se razlikuje među genetički različitim jedinkama. Molekule razreda I izražavaju na svojim membranama gotovo sve nukleirane somatske stanice, a molekule razreda II samo imunosne stanice, ponajprije monociti-makrofagi i druge stanice koje prezentiraju antigen (engl. *antigen presenting cells*, **APC**), B limfociti, i neki aktivirani T limfociti.

Dvije vrste molekula MHC omogućuju prezentaciju dviju različitih vrsta antigena, koje prepoznaju različite subpopulacije T limfocita. Egzogeni antigeni (bakterijski, izvanjski topljivi antigeni) predočavaju se T limfocitima u sklopu antigena razreda MHC II na površini specifičnih stanica koje prezentiraju antigen (APC), a prepoznaju ih T limfociti CD4. Ti egzogeni proteini bivaju upijeni endocitozom u APC, podliježu razgradnji na peptide od 12-20 aminokiselina u endosomima, spajaju se s molekulama MHC II koje se nanovo sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu i kompleks peptid-molekula MHC II se transportira iz endosoma na površinu APC. Endogeni antigeni (tumorski antigeni, vlastiti minorni transplatacijski antigeni, virusni antigeni – virusni genom se ugrađuje u vlastiti genom domaćina, drugi vlastiti antigeni) sintetiziraju se u citoplazmi (ribosomi), razgrađuju se na peptide veličine 8-10 aminokiselina u tzv. proteosomima i prebacuju su u endoplazmatski retikulum gdje se vežu na novosintetizirane molekule MHC I. Važnu ulogu u prijenosu peptida iz citoplazme u endoplazmatski retikulum igraju tzv. transportni proteini (**TAP1** i **TAP2**). Kompleks peptid-MHC potom putuje endoplazmatskim retikulumom i Golgijevim aparatom na površinu stanice. Limfocit CD4<sup>+</sup> i limfocit CD8<sup>+</sup> imaju jednako građen varijabilni (klonotipski ili idiotipski) receptor, kojim specifično vežu kompleks antigenski peptid-varijabilni dio molekule MHC, dok molekule CD4 i CD8, koje su konstantne građe, vežu konstantni dio molekula MHC II odnosno MHC I.

Bitna razlika između ovih dvaju različitih načina prezentacije i prepoznavanja antigena jest da limfociti CD4<sup>+</sup> prepoznaju izvanjske antigene koji su prezentirani na specifičnim (profesionalnim) stanicama – APC, dok limfociti CD8<sup>+</sup> prepoznaju endogene antigene koji su prezentirani na stanicama koje ih sintetiziraju – tumorske stanice, stanice zaražene virusima i različite druge stanice koje nisu profesionalne APC.

I reakcija dviju subpopulacija T limfocita je različita:  $CD4^+$ -stanice proliferiraju, luče citokine<sup>7</sup> koji aktiviraju akcesorne imunostne stanice (reakcija kasne preosjetljivosti na staničnoj imunosti) ili potiču proizvodnju protutijela (suradnja T i B limfocita). S druge strane,  $CD8^+$ -stanice sazrijevaju u citotoksične/ubilačke stanice, koje zadobiju sposobnost izravnog ubijanja stanica koje imaju isti tuđi antigen i MHC kao i stanica na koju su senzibilizirani. U mnogim reakcijama stanične imunosti, primjerice u reakciji odbacivanja alogenskih transplantata tkiva i organa, dolazi do aktivacije i suradnje obiju subpopulacija T limfocita (tzv. T – T suradnja). Suradnja se očituje u tome da  $CD4^+$ - limfociti luče interleukin – 2 (IL-2) koji je potreban za sazrijevanje citotoksičnih ( $CD8^+$ ) limfocita. Zbog toga se  $CD4^+$ - limfociti često nazivaju i pomagačkim (engl. *helper*) T limfocitima ( $T_H$ ), premda to nije sasvim ispravno, jer je u nekim slučajevima dokazano da  $CD4^+$ - stanice mogu ubijati ciljne stanice, a da  $CD8^+$ - stanice mogu imati pomagačku funkciju (Slika 7).



**Slika 7.** Prerada i predočavanje antigena T limfocitima

Skraćenice: TAP = *Transporters Associated with Antigen Processing* (prijenosnici povezani s preradom antigena); TCR = receptor T limfocita; MHC = glavni kompleks gena tkivne podudarnosti; IL = interleukin; IFN = interferon; Tc/k = citotoksični/ubilački T limfocit; CTL = citotoksični T limfocit.

U imunosti na maligne tumore je dominantna uloga  $CD8^+$  limfocita tj. citotoksičnih stanica, premda ima dokaza za određenu ulogu  $CD4^+$ - limfocita. Osnovni razlog zašto su kod malignih tumora dominantni mehanizmi posredovani  $CD8^+$ - stanicama jest taj što tumorske

<sup>7</sup> Citokini su topljivi polipeptidi koje stvaraju i izlučuju različite stanice nakon podražaja, a omogućuju komunikaciju između stanica i time usklađuju njihovu funkciju. Uglavnom djeluju lokalno, osim kod sistemskih upala gdje je njihova proizvodnja toliko velika da ulaze u sistemni optok i djeluju na različite organe i sustave. Postoje 4 glavne skupine citokina: interleukini, interferoni, citoksini i čimbenici poticanja kolonija.



stanice u načelu izražavaju samo molekule razreda I MHC, pa tumorski antigeni (TA) na površini tumorske stanice mogu prepoznati samo CD8<sup>+</sup>- T limfociti. S druge strane, neke leukemije i limfomi, kao i normalne stanice od kojih su potekli, mogu izražavati na površini i molekule razreda II MHC. Također, neki čimbenici, poput gama-interferona, mogu potaknuti izražavanje molekula MHC II na tumorskim stanicama, a neki bi tumori mogli otpuštati topljive TA, koji bi mogli dospjeti do APC i biti predočeni u sklopu molekula MHC II. Stoga se uloga mehanizama posredovanih CD4<sup>+</sup>- limfocitima u protutumorskoj imunosti ne smije zanemariti.

Prepoznavanje antigena na površini stanica u sklopu molekula MHC u načelu vodi aktivaciji, proliferaciji i sazrijevanju imunskih efektornih stanica (senzibilizirane CD4<sup>+</sup>- stanice i citotoksične CD8<sup>+</sup>- stanice). Međutim, pokusi s topljivim izvanjskim antigenima (koje prepoznaju CD4<sup>+</sup>- stanice) pokazuju da samo prepoznavanje kompleksa MHC-antigen (peptid) nije dovoljno za aktivaciju i sazrijevanje limfocita. Da bi nastala aktivacija, potrebna je i tzv. kostimulacija, koja priskrbuje tzv. sekundarni signal T limfocitima. Taj sekundarni signal (primarni je prepoznavanje kompleksa MHC-antigen) nespecifičan je i nastaje prepoznavanje neke molekule na stanici koja predočava antigen (APC) s pomoću odgovarajuće receptorske molekule na T limfocitima. Taj sekundarni signal potreban je za pojačavanje unutarstaničnog signala u T limfocitima, koji je potreban za stvaranje sekundarnih glasnika, aktivacije gena i proliferacije limfocita. Najpoznatiji put koji sudjeluje u kostimulaciji jest onaj posredovan molekulama B-7 (ligand na APC) i molekulama CD28/CTLA4 (receptori na limfocitima).

Po pojednostavnjenoj teoriji o imunskoj toleranciji, pri nedostatku kostimulacijskog signala, samo prepoznavanje kompleksa MHC-antigen vodi do inaktivacije klonalnih limfocita, odnosno do specifične imunološke tolerancije. Samo profesionalne APC (monociti-makrofazi, dendritične stanice u krvi, koži i limfnim organima) mogu priskrbiti sekundarni signal; prepoznavanje antigena na drugim stanicama (neprofesionalne APC) vodi redovito inaktivaciji klonalnih limfocita, odnosno toleranciji. Uloga kostimulacijskih signala pri aktivaciji CD8<sup>+</sup>- limfocita znatno je manje poznata (Čulo, 2000). Podraživanje limfocita CD8<sup>+</sup> pomažu limfociti CD4<sup>+</sup>. Kostimulacijski signal s predočne stanice nedostatan je za aktivaciju limfocita CD8<sup>+</sup>, a dostatan za aktivaciju limfocita CD4<sup>+</sup>. Limfocit CD4<sup>+</sup> može pojačati kostimulacijski signal na dva načina: limfocit CD4<sup>+</sup> potakne predočnu stanicu na stvaranje kostimulacijskih molekula B7 pa pojačani drugi signal potakne stvaranje IL-2 u limfocitu CD8<sup>+</sup> ili limfocit CD8<sup>+</sup> rabi IL-2 iz limfocita CD4<sup>+</sup> za svoju proliferaciju. IL-2 potiče izražaj visokoafinitetnog receptora za IL-2 na limfocitima CD8<sup>+</sup>.

Hoće li nastati aktivacija klona limfocita, odnosno stvaranje imunskih efektor ili njegova inaktivacija, odnosno tolerancija ovisi o nizu drugih čimbenika. Između ostalog, to ovisi i o koncentraciji antigena na površini stanice (to pak ovisi o kakvoći prerade antigena u stanici, prijenosu peptida na površini stanice, afinitetu antigena (peptida) za molekule MHC i o izražajnosti/gustoći molekula MHC na površini), afinitetu specifičnih receptora na T limfocitima za kompleks MHC-antigen i o prisutnosti antigena tijekom fetalnog razvoja u timusu. Prema općeprihvaćenoj Burnetovoj teoriji klonске selekcije, nezreli limfociti tijekom fetalnog razvoja, propadaju nakon prepoznavanja specifičnog antigena u primarnim limfnim organima (tzv. teorija iščeznuća klona odnosno klonске delecije). Tijekom fetalnog sazrijevanja u timusu T limfociti se normalno susreću s vlastitim antigenima koji su prisutni u timusu, a to su vlastiti antigeni MHC, organskospesificni antigeni timusa te topljivi antigeni koji dospijevaju u timus. U načelu, samo će klonovi limfocita koji reagiraju na te antigene iščeznuti i na njih će se razviti tolerancija, dok će klonovi koji reagiraju na druge antigene, koji ne dospijevaju u timus (poglavito netopljivi organskospesificni antigeni parenhimalnih organa i unutarstanični antigeni) preživjeti i naseliti periferne limfne organe. Ti klonovi su potencijalni izvor autoimunskih reakcija u zreloj dobi. Međutim, autoimunsne bolesti su razmjerno rijetke, jer stanice parenhimalnih organa slabo predočuju antigen T limfocitima (nemaju MHC II molekule, nemaju kostimulacijske molekule itd.), odnosno postoji mogućnost stvaranja tzv. periferne tolerancije. Mehanizmi periferne tolerancije (koji su zasad uvijek slabo poznati) obuhvaćaju deleciju klona, aktivno prigušenje autoreaktivog klona (supresijske stanice, supresijski citokini, veto-stanice), imunsko zanemarivanje (ignoranciju) i dr. Relativno slaba imunost koja se stvara na tumorske antigene malignih tumora ili je posljedica slabog predočavanja i prepoznavanja antigena ili razvitka tolerancije na te antigene (Čulo, 2000).

### ***2.2.3.1. Tumorski antigeni***

Tumorskim antigenima (TA) naziva se bilo koja tvar malignih stanica koja nije prisutna u normalnim stanicama istog tkiva i stadija razvoja, a koja uzrokuje imunoreakciju u prirodnom domaćinu ili nakon presađivanja tumora u singeničnoga primaoca. Prema kemijskom sastavu to su uglavnom glikoproteini nastali preradbom tumorskih proteina koji se T limfocitima predočuju (prezentiraju) vezani za molekule MHC I ili MHC II. Prema smještaju mogu se podijeliti na antigene na staničnoj površini, antigene u unutrašnjosti stanice i antigene koje tumorske stanice otpuštaju u okolinu. Antigeni na površini tumorskih stanica

moгу izazvati imunosno odbacivanje tumora, a po svojim su svojstvima nalik na antigene tkivne podudarnosti. Također mogu služiti kao teorijski cilj protutijelima ili senzibiliziranim limfocitima koji mogu izazvati lizu tumorske stanice. To značenje nemaju antigeni u unutrašnjosti stanice, ali su oni zanimljivi u proučavanju procesa zloćudne preobrazbe i kao biljezi malignih stanica.

Antigeni se mogu naći u izvanstaničnoj tekućini nakon nekroze tumorskih stanica ili bivaju spontano otpušteni od površine, a čini se da su odgovorni za proizvodnju blokadnih čimbenika koji uzrokuju imunološko pospješenje rasta.

Postoje dvije vrste tumorskih antigena na temelju njihove specifičnosti:

- **tumorski specifični antigeni (TSA, prema engl. *tumour-specific antigens*)** i
- **tumoru pridruženi antigeni (TAA, prema engl. *tumour-associated antigens*).**

➤ ***Tumorski specifični antigeni (TSA)*** ne nalaze se ni na kojoj normalnoj stanici, tj. doista su specifični samo za tumor. Oni mogu nastati zbog mutacije u tumorskim stanicama, koje zatim proizvode promijenjene stanične proteine. Oni se prerađuju u citosolu i kao novi peptid pridružuju molekulama MHC I, pa mogu potaknuti staničnu imunost. Neki tumorski antigeni posljedica su abnormalne glikolizacije, kojom se dodaju ugljikohidratni epitopi<sup>8</sup> koji nisu uobičajeni na normalnim stanicama. Pronađeni su u tumorima izazvanih kemijskim (policiklički ugljikovodici, aromatski amini, azo-boje i nitrozo-spojevi) ili fizičkim kancerogenima (ionizirajuće zračenje, kronični mehanički ili toplinski podražaji, implantacija u tkivo inertnih listića, npr. celofana ili metala, koji vjerojatno prekidaju međustaničnu komunikaciju) kao i u nekim tumorima induciranih virusima DNA (papova-virusi, adeno-virusi i herpes-virusi) ili RNA (kod životinjskih vrsta virus Rousova sarkoma, virus Grosseove leukemije, kod ljudi virus ljudske leukemije stanica T tj. HTLV, virus imunodeficijencije tj. HIV)

➤ ***Tumoru pridruženi antigeni (TAA)*** nisu novi domaćinu, tj. nisu isključivo vezani za tumorske stanice, nego se nalaze na nekim stanicama embrijskog tkiva (tzv. onkofetalni ili embrionalni tumorski antigeni kao što su karcinoembrijski antigen i  $\alpha$ -fetoprotein), na stanicama za vrijeme virusne infekcije (virusni antigeni), ili pak i u normalnim stanicama, ali u krajnje niskoj koncentraciji (neoantigeni tj. tumorski antigeni zajednički histološkom podrijetlu tumora). U ovom slučaju organizam nije stvorio imunosnu

---

<sup>8</sup> Epitop je najmanja antigenska determinanta (može imati samo 3 aminokiseline) koja još predstavlja antigenski entitet i može izazvati specifičnu imunoreakciju. Prepoznaje ga protutijelo ili antigenski receptor limfocita.

toleranciju na te u osnovi normalne molekule, pa reagira na njih kad ih (pojačano) izražavaju tumorske stanice.

Tumorski antigeni (TAA ili TSA) koji mogu izazvati transplatacijsku reakciju odbacivanja tumora, sličnu reakciji odbacivanja tuđeg transplantanta, nazivaju se tumoru pridruženi transplatacijski antigenima **TATA** (prema engl. *tumour-associated transplantation antigens*) odnosno tumor-specifični transplatacijski antigeni **TSTA** (prema engl. *tumour-specific transplantation antigens*) ili antigenima odbacivanja tumora (**TRA**, prema engl. *tumour rejection antigens*). Eventualna imunoterapija malignih tumora zasniva se na postojanju TSTA odnosno TRA, jer se pojačavanjem (manipulacijom) imunosne reakcije na te antigene može inhibirati rast tumora.

Za otkrivanja tumorskih antigena razrađen je ili prilagođen niz laboratorijskih metoda. To su metode *in vivo*, gdje se promatra reakcija cijelog organizma na tumorske antigene i metode *in vitro*, gdje se promatra reakcija izoliranih pojedinih komponenata organizama (stanice limfocita ili seruma). Posebno treba izdvojiti metode genetičkog inženjstva koje omogućuju izolaciju i karakterizaciju čitavih antigena na molekularnoj razini.

### 2.2.3.2. Imunoreakcija na tumor

U reakciju na tumorske stanice uključeni su nespecifični oblici imunosti, kao i oba oblika specifične imunosti: stanični i humoralni. Stanična imunost uključuje citotoksično djelovanje T limfocita, NK stanica, makrofaga, monocita, mastocita, eozinofila, pa i drugih polimorfonuklearnih leukocita. Humoralna imunost čini čitav spektar protutijela različitih razreda i podrazreda, koja u reakciji s površinskim tumorskim antigenima mogu u različitim uvjetima uzrokovati cijeli niz konačnih učinaka: od brzog potpunog uništenja tumorskih stanica do promjene stanične površine koja zaštićuje tumor. Posebno se snažna imunost razvija protiv virusa koji uzrokuju tumore, a ne protiv samih tumorskih stanica.

#### ➤ *Stanična imunost*

- **Citotoksični T limfociti** mogu pri izravnom dodiru uništiti tumorsku stanicu, a mehanizam ubijanja jednak je mehanizmu drugim oblicima stanične imunosti. T limfociti CD8<sup>+</sup> prepoznaju tumorske antigene predočene (prezentirane) u sklopu molekule MHC-I. Na žalost, brojni tumori slabo izražavaju MHC-I, pa to ograničava

ulogu citotoksičnih limfocita. Sposobnost ubijanja imaju senzibilizirani limfociti<sup>9</sup> iz imuniziranih davalaca, ali i iz nosilaca progresivnog tumora. Senzibilizirani T limfociti, nadalje u dodiru s antigenom otpuštaju niz tvari (citokini) koje imaju različite važne biološke učinke. Na žalost, tumori, za razliku od bakterija ili virusa, ne izazivaju pojavu protuupalnih citokina i kemokina<sup>10</sup> koji su potrebni za suradnju predočnih stanica i T limfocita specifičnih za antigen.

- **Stanice NK** mogu ubiti tumorske stanice pri izravnom dodiru, ali bez prethodne senzibilizacije. Nakon što se prikvači za tumorsku stanicu, NK stanica otpušta neke topljive čimbenike (perforine, lizolecitin, proteaze), koji uzrokuju njezinu lizu (otapanje). NK stanica može se odvojiti od ubijene tumorske stanice i već za nekoliko sati može uspješno napasti novu tumorsku stanicu. Sve tumorske stanice nisu podjednako osjetljive na lizu posredovanu NK stanicama. Brojne su tvari koje potiču aktivnost NK stanica od kojih je najvažniji interferon koji ne povećava samo njihovo djelovanje već djeluje i kao središnji regulator njihovih funkcija, na čemu se temelje još uvijek prilično neuspješni pokušaji liječenja tumorskih bolesti kod ljudi. IL-2<sup>11</sup> također povećava njihovu aktivnost. Osim izravne lize tumorskih stanica, NK stanice mogu također sudjelovati u trovanju stanice ovisno o protutijelu (**ADCC**, prema engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) Sve je raširenije mišljenje da je važna uloga NK stanica u sprječavanju nastanka i rasta primarnih tumora.
- **Makrofazi i monociti** također su aktivni sudionici u aferentnom (prepoznavanje i preradba antigena) i eferentnom (aktivnost citotoksičnih T limfocita i makrofaga u reakcijama s antigenom) dijelu imunoreakcije na tumor. Protutumorska aktivnost makrofaga temelji se na litičkim enzimima i metabolitima reaktivnoga kisika i dušikova oksida. Naime, T stanice i makrofagi mogu surađivati u protutumorskom djelovanju, jer je **IFN- $\gamma$**  (gama-interferon, pretežno djeluje imunoregulacijski), citokin podrijetla T stanica, snažni aktivator makrofage te potiče proizvodnju reaktivnih kisikovih metabolita ili lučenje **TNF- $\alpha$** <sup>12</sup> (čimbenik tumorske nekroze), citokina koji lizira nekoliko vrsta tumorskih stanica.

---

<sup>9</sup> Senzibilizirani limfociti su limfociti sazreli nakon dodira sa antigenom.

<sup>10</sup> Kemokini su mali citokini uključeni tijekom upale u kemotaksiju, migraciju i aktivaciju stanica, posebice fagocita i limfocita.

<sup>11</sup> IL-2 ili interleukin-2 je citokin kojeg luče leukociti (pomagački T limfociti) i djeluju na leukocite (citotoksični T limfociti, B limfociti, NK stanice).

<sup>12</sup> TNF-  $\alpha$  je citokin kojeg luče monociti-makrofazi.

➤ *Humoralna imunost*

Humoralna imunost ima u otpornosti na tumor ulogu koja nije jednoznačna i zbog toga ju je teško općenito definirati. Dok su svi tumori uglavnom osjetljivi na efekte stanične imunosti, osjetljivost na protutijela slaba je i različita. Protutijela mogu nakon vezanja s tumorskom stanicom učiniti ovu podložnu lizi, posredovanoj NK stanicama ili makrofagima (**stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima**). Humoralna imunost (a time i CD4<sup>+</sup>-limfociti, kao pomagačke stanice) mogla bi biti važna u slučajevima gdje bi onkogeni virusi mogli imati ulogu u onkogenezi (npr. virus papiloma kod cervikalnog raka). Stvorena antivirusna protutijela neutralizirala bi virus i time prevenirala malignu transformaciju. Nadalje, protutijela su vjerojatno važna u sprječavanju hematogenog širenja tumorskih stanica (prevencija metastaza). Protutijela bi teorijski mogla imati ulogu i kod nekih tumora limfohematopoetskog podrijetla, koji otpuštaju TA u cirkulaciju i koji su osjetljivi na citolitički učinak protutijela.

**2.2.3.3. *Izmicanje tumora imunosnoj obrani***

Prema teoriji imunosnog nadzora, u tijelu se rađaju maligne stanice, ali ih uništava imunosni sustav koji čuva antigenski i genski integritet organizma. Poslije je predloženo da je osnovna uloga imunoreakcije eliminacija tumorskih stanica u njihovom samom subkliničkom začetku, a ne kad su se one već umnožile u klinički zamjetljiv tumor. Ta je teorija nakon provjeravanja na kliničkim tumorima doživjela vrlo ozbiljnu kritiku jer spontano nastale tumorske stanice nemaju uvijek, ili čak većinom nemaju svojstvo imunogeničnosti<sup>13</sup>, a kad je ono i prisutno, obično je preslabo da bi izazvalo imunosno odbacivanje. Usprkos tome, moguće je da postoji učinkovit imunosni nadzor koji uništava tumorske stanice u samom začetku, ali mi to ne opažamo.

Međutim, čak i kada se u domaćinu pokrene imunosni odgovor protiv tumora, ipak je najčešći prirodni tijek tumorske bolesti progresivan rast tumora i smrt domaćina. Predloženo je mnogo hipoteza koje nastoje objasniti da tumor raste unatoč postojanju protutumorske reakcije.

---

<sup>13</sup> Imunogeničnost je svojstvo antigena da izazove specifičnu imuoreakciju (obrambena reakcija) kad se na određen način unese u organizam.

- ✓ **Slaba imunogeničnost tumorskih antigena ili nedostatak molekula MHC I** može omogućiti tumoru da nezamijećeno izmakne imunosnom nadzoru jer citotoksični limfociti CD8<sup>+</sup> mogu prepoznati samo onaj antigenski peptid predodčen na molekulama MHC I što određuje njihovu citotoksičnost. Utvrđeno je da brojne tumorske stanice imaju malo ili uopće nemaju molekule MHC I što ukazuje na vrlo lošu prognozu.
- ✓ **Imunoselekcija** pretpostavlja da tumorske stanice osjetljive na imunološki napad tj. one koje izražavaju jaki imunogen, propadaju, dok u tumoru prevladavaju otporne stanice koje su izgubile taj imunogen ili izražavaju druge, slabije imunogene.
- ✓ **Antigenska modulacija** jest pojava reverzibilnoga nestanka tumorskih antigena s površine stanica (npr. antigena TL u leukemija), ako su one izložene protutijelima. Sve dok postoje citotoksična protutijela u okolišu stanice, leukemije TL ne izražavaju svoje antigene (pojava "maskiranja" tj. prikrivanja antigena).
- ✓ **Nedostatak drugog signala, potrebnog za aktivaciju T limfocita** mogao bi također biti uzrokom izbjegavanja imunoreakcije.
- ✓ **Otpuštanje antigena** u izvanstaničnu tekućinu mnogo je izraženije u tumorskim stanicama nego u normalnim. Međutim, za letalno djelovanje protutijela ili citotoksičnih stanica na tumorsku stanicu potrebna je određena lokalna stabilnost i gustoća tumorskih antigena na površini. Ako se ti antigeni neprestano otpuštaju, oko tumora se stvara lokalna zaštitna "dimna zavjesa".
- ✓ **Teorija "prošuljavanja" kroz imunosnu obranu** (prema engl. *sneaking though*) pretpostavlja da je u početku broj tumorskih stanica premalen da svojim antigenima stimulira imunosni sustav, a poslije, kad je količina antigena dostatna da izazove imunoreakciju, tumor je već uspostavljen.

- ✓ **Imunosna nereaktivnost** može biti uzrokom nesmetanoga tumorskoga rasta. Tolerancija se pojavljuje kod životinja kao specifična imunotolerancija stečena u neonatalno doba prema vertikalno<sup>14</sup> prenesenim onkogeničnim virusima, koji kasnije mogu izazvati tumor. Tolerancija se može razviti i zbog neprimjerenog predočenja tumorskih antigena. Drugi oblik imunosne neaktivnosti jest nespecifična imunodeficijencija koja može biti prirodna, i jatrogena ili uzrokovana tvarima koje izlučuju tumori (npr. VEGF, IL-10, TGF- $\beta$  koji obuzdava poticanje T limfocita s IL-2).
  
- ✓ **Imunoprivilegirana mjesta** neka su mjesta u organizmu koja nisu dostatno pod nadzorom imunosnoga sustava (npr. mozak ili prednja očna komorica), pa mogu pružiti utočište tumorima.
  
- ✓ **Teorija blokadnih čimbenika** jedno je od objašnjenja kako tumor izmakne obrani. Naime, nakon otkrića da se protiv tumorskih antigena mogu proizvesti protutijela, nastojalo se zaštititi životinje od tumora prijenosom već gotovih protutijela. Međutim, umjesto zaštite protutijelima postiglo se pospješenoje rasta tumora. Serum nosioca progresivnoga tumora može *in vitro* blokirati staničnu citotoksičnost, dok serum organizma s regresivnim tumorom nema to djelovanje. Blokadni čimbenici mogli bi biti sami tumorski antigeni, protutijela ili imunokompleksi (Taradi, 2004).

## **2.3. TERAPIJSKI POSTUPCI**

### **1. KIRUŠKA ONKOLOGIJA**

Kiruški zahvat je najstariji način liječenja zloćudne bolesti, koji i danas, unatoč razvoju novih komplemntarnih načina liječenja, zauzima važno mjesto u liječenju bolesnika sa zloćudnom bolesti. Prije samog kiruškog zahvata potrebna je pažljiva procjena općega zdravstvenog stanja bolesnika s posebnim naglaskom na funkcije vitalnih organa i procjenu kardiovaskularnog rizika, jer bolesnici oboljeli od karcinoma najčešće pripadaju starijoj životnoj dobi. Od presudne je važnosti spoznavanje stupnja proširenosti zloćudne bolesti jer

---

<sup>14</sup> Vertikalni prijenos virusa je pojava da su mnogi virusi endogeni, tj. naslijeđeno uklopljeni u genom i tako prisutni u svim stanicama jednog organizma, pa se prenose na potomstvo.



je radikalni kirurški zahvat indiciran samo u slučaju lokalnih i lokoregionalno proširenih tumora. Kirurški se pristup, s različitim vremenskim otklonom, može kombinirati s drugim načinima liječenja kao što su kemoterapija i radioterapija bilo prije ili poslije samog kirurškog zahvata. Osim terapijske, kirurgija ima preventivsku, dijagnostičku, potpurnu i rehabilitacijsku ulogu u onkologiji.

## **2. RADIOTERAPIJA**

Radioterapija je lokalni način liječenja tumora i drugih bolesti visokoenergijskim (ioniziranim) zračenjem, uz što veću zaštitu okolnoga, zdravog tkiva. Provodi se x-fotonima (rentgenske zrake),  $\gamma$ -fotonima, visokoenergijskim elektronima, a moguće je primijeniti i druge visokoenergijske čestice (protoni, neutroni). Dijeli se na vanjsku radioterapiju i unutrašnju tzv. brahiradioterapiju gdje se radioaktivni izvor postavlja u tijelo bolesnika. Najčešće se provodi konvencionalnim frakcioniranjem tijekom najosjetljivijih faza staničnog ciklusa (u fazi mitoze ili kasne G2 faze), odnosno ukupna terapijska doza podijeli se u veći broj istih doza (frakcija) koje se apliciraju svaki dan. Može biti neoadjuvantna (prije kirurškog zahvata), primarna (jedini način antitumorskog liječenja), adjuvantna (nakon kirurškog liječenja), te palijativna.

## **3. SISTEMSKA TERAPIJA**

### **a) KEMOTERAPIJA**

Kemoterapija je jedan od osnovnih oblika sistemskog (sustavnog) liječenja tumora koja se primjenjuje kod 60-70% bolesnika sa zloćudnim bolestima. Citostatici se mogu ordinirati kao monokemoterapija (ordinacija samo jednog citostatika u liječenju raka) ili kao polikemoterapija (ordinacija više citostatika zajedno). (Vidi poglavlje 2.6. Kemoterapija).

### **b) IMUNOTERAPIJA**

Imunoterapija zauzima važno mjesto u liječenju solidnih (kompaktnih, bez šupljina) i hematoloških tumora. Može biti aktivna i pasivna, specifična i nespecifična, te stanična i humoralna. (Vidi poglavlje 2.4. Imunoterapija).

**c) HORMONSKA TERAPIJA**

Hormonska terapija koristi se u liječenju tumora koji nastaju iz hormonski ovisnih tkiva (rak dojke, endometrija tj. maternice, prostate). Odgovor je determiniran hormonskom ovisnošću-postojanjem steroidnih hormonskih receptora (tkivno-specifični jezgri proteini) u tumoru na koje se vežu odgovarajući steroidni hormoni. Kompleks hormon-receptor veže se za DNA, nakon čega dolazi do indukcije genske ekspresije, odnosno do sinteze specifičnih proteina. U steroidne hormone se ubrajaju proteini koji vežu estrogene, progestine, androgene, glukokortikoide, mineralokortikoide, tiroidne hormone. Ima odličan terapijski odnos, malu toksičnost i veliku učinkovitost, a nedostatak je ograničenost primjene samo na o hormou ovisne tumore.

**4. LASERSKA TERAPIJA**

Laserska terapija omogućuje intervencije na vrlo malim operacijskim poljima, u uskim otvorima, što nije moguće klasičnim instrumentima. Laserska se svjetlost može precizno fokusirati na tkivo, praktički na jednu točku, uz veliku koncentraciju energije. Tkivo tu energiju apsorbira i ona se pretvara u toplinu. Konačni su učinci izazivanje opeklina, koagulacije, vaporizacije, karbonizacije ili rezanje tkiva, ovisno o količini apsorbirane energije. Okolno tkivo ostaje pritom neoštećeno, zahvaljujući tome što je loš vodič topline. Laser ne dodiruje biološko tkivo, koagulacija u operacijskom polju je beskrvna, te nema infekcije jer je postupak sterilan. Cijeljenje tkiva je brzo i bez ožiljka, nema edema niti boli. Laseri u određenom broju slučajeva ne rješavaju bolest, ali sprječavaju njezin daljnji tijek i razvoj komplikacija. U medicini se uglavnom koriste tri vrste lasera: CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, argon, a u uporabu ulazi i četvrti, *excimer*-laser.

**5. FOTODINAMIČKA TERAPIJA**

Fotodinamička terapija označuje interakciju senzibilizatora, svjetla i kisika. Njezino osnovno načelo sastoji se u tome da se bolesniku aplicira intravenski fotosenzibilizator (hematoporfirin, fotofrin II) koji se selektivno nakuplja u tumorskome tkivu. Ono se potom izlaže svjetlu (npr. argonski laser koji stvara svjetlo od 400 nm (plavo svjetlo) do 630 nm (crveno svjetlo)) da bi se ostvario terapijski učinak. Danas se u kliničkoj praksi najčešće rabi crveno svjetlo (630 nm) zbog dublje penetracije u tkivo. Djelovanje fotodinamičke terapije

temelji se na direktnom i indirektnom učinku na staničnu smrt. Primjenjuje se kod površinskih i malignih tumora (npr. tumori u području glave i vrata, tumori jednjaka, bronha, oka) zbog slabe prodornosti laserskog svjetla (8-10 mm). Nakon same terapije potrebno je izbjegavati sunce u periodu od 8 tjedana zbog fotosenzibilizacije kože. U svakodnevnoj kliničkoj praksi rijetko se koristi.

## **6. GENSKA TERAPIJA**

Gensko liječenje može se definirati kao unos novoga genskog materijala u stanice bolesnika radi povoljnog terapijskog učinka. Pristupi genskom liječenju tumora mogu se podijeliti na nekoliko područja kao što su: nadomještanje promjena u onkogenima i tumor-supresorskim genima, molekularna kemoterapija (uvođenjem gena za enzim u tumorske stanice koji pretvara netoksični prekursor u toksični prekursor tj. lijek koji ubija tumorsku stanicu, nakon čega se bolesniku sistemski daje taj prekursor), zaštita matičnih stanica koštane srži uvođenjem gena **MDR1** (engl. *multidrug resistance*) u njih koji ih čini otpornijima na kemoterapiju i omogućuje primjenu većih doza kemoterapijskih lijekova, imunogensko liječenje (npr. uvođenje gena za citokine u tumorske stanice, tumor-infiltrirajuće limfocite tzv. **TIL** ili fibroblaste čime se postiže sinteza citokina u samom tumoru, a izbjegavaju se neke nuspojave sistemske primjene citokina), prijenos gena *ex vivo* i *in vivo* pomoću virusnih (retrovirusi, adenovirusi i dr.) ili nevirusnih (liposomi) vektora (prijenosnika), tumor-specifična ekspresija (npr. unos gena u tumorske stanice koji se stavljaju pod kontrolu promotora koji su selektivno ili specifično aktivni u tumorskim stanicama), onkoliza (virusna infekcija koja uništava tumor, a pošteduje zdrave stanice).

## **7. HIPERTERMIJA**

Hipertermija je stanje nekog tijela čija je temperatura veća od normalne. Označuje vrstu liječanja u onkologiji zbog dokazanoga pozitivnog učinka povišene tjelesne temperature (od 42-45 °C) u liječenju maligne bolesti (površinski tumori glave, vrata i kože) (Šamija i sur., 2006). (Vidi poglavlje 2.5. Hipertermija).

## **2.4. IMUNOTERAPIJA**

Otkriće tumorsko specifičnih antigena i imunoreakcije domaćina tumora na njih bili su temelj u nizu pokušaja da se u liječenju bolesnika sa zloćudnim tumorima primijene imunološke metode – imunoterapija (bioterapija) tumora. Imunoterapijom se nastoji poticati i pojačati imunoreakcija kako bi se uništile tumorske stanice koje su izvan domašaja kirurškog liječenja, zračenja ili kemoterapije.

Iako imunoterapija ima povijest dulju od jednog stoljeća, ustalila se kao prihvaćen način liječanja u malom broju tumorskih bolesti, a brojne imunoterapijske strategije ostale su u pokusnoj fazi. Imunoreakcija nije dovoljno snažna da uvjetuje regresiju već uznapredovalog tumora, jer u najboljem slučaju može uništiti svega  $10^6$ - $10^9$  tumorskih stanica, ali može pomoći u eliminaciji manjeg broja tumorskih stanica preostalih nakon primjene standardnih načina liječenja tumora: kirurškoga zahvata, zračenja i kemoterapije. Imunoterapijskim se postupcima nastoji u prvom redu potaknuti produkcija (izlaganje) reaktivnih limfocita i njihovih proizvoda, a ne serumskih antitijela, jer upravo limfociti razaraju tumorske stanice. Osim imunih limfocita, tumorske stanice uništavaju aktivirani makrofagi i prirodene stanice ubojice (NK stanice). Staničnu protutumorsku otpornost potiču i specifična protutijela aktivirajući mehanizam stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima.

Postoji nekoliko tipova imunoterapija:

### **I. Pasivna imunoterapija**

Pasivna imunoterapija tumora zaniva se na prijenosu specifičnih protutumorskih protutijela, priređenih u drugom organizmu iste ili različite vrste. Mehanizam djelovanja antiseruma uglavnom je izravna citotoksičnost uperena protiv tumorskih stanica, ali se može protutijelima, kao specifičnim nosačima, uvesti selektivno u tumorske stanice neki toksin (npr. ricin), citostatik ili radioaktivni izotop (imunotoksini). Osnovni problem pri tom terapijskom postupku je taj što svi tumori nemaju iste antigene, a također su im neki antigeni zajednički s normalnim stanicama. Osim toga, protutijela oskudno prodiru u solidne tumore, a sljedeća poteškoća je u tome što tumorski antigeni u cirkulaciji mogu neutralizirati primijenjena protutijela. Tumorski se čvor sastoji od vrlo heterogene populacije zloćudnih stanica, pa bilo koja vrsta liječenja pogađa samo osjetljive stanice, dok preostala mala skupina stanica može opet obnoviti tumor.

## II. Adoptivna imunoterapija

Prijenos senzibiliziranih (imunih) stanica limfocita (npr. koštane srži, slezene ili limfnoga čvora) može zaštititi životinju od tumorskog transplatata ili usporenje njegova rasta, a rjeđe izazvati regresiju već uspostavljenoga tumora. Limfociti bolesnika mogu se također izložiti senzibilizaciji u dodiru s antigenom vlastitog tumora *in vitro* i zatim se mogu vratiti u isti organizam. Pokušava se također potaknuti sazrijevanje i aktivnost NK stanica primjenom IL-2. Inkubacija stanica, izoliranih iz periferne krvi bolesnika, s IL-2 obavlja se izvan tijela, a zatim se vlastite, limfokinima<sup>15</sup> aktivirane stanice (**LAK** od engl. *lymphokine-activated killer cells*) vraćaju bolesniku i razaraju različite ciljne tumorske stanice. Sličan se postupak, ali s malim dozama IL-2 u kulturi, može provesti i s citotoksičnim limfocitima koji infiltriraju tumor (**TIL**, prema engl. *tumour-infiltrating lymphocytes*) koji selektivno razaraju stanice vlastita tumora te su djelotvornije od LAK stanica.

## III. Specifična aktivna imunoterapija

Aktivna imunizacija bolesnika mogla bi se provesti antigenima vlastitog tumora, pri čemu se vlastite tumorske stanice prethodno ubiju zračenjem, toplinom, uzastopnim smrzavanjem i odmrzavanjem i sl., a zatim se same ili češće zajedno s nekim drugim adjuvansom<sup>16</sup> ubrizgaju bolesniku, najčešće pod kožu.

No rijetko se primjenjuje, a rezultati dobiveni kliničkom primjenom još su prilično kontroverzni. U novije se vrijeme tumorski antigen pokušava izolirati, definirati i klonirati, a zatim prirediti antigenični peptid koji se primjenjuje kao cjepivo.

## IV. Nespecifična aktivna imunoterapija

Poznata su mnoga sredstva koja mogu izazvati nespecifičnu stimulaciju retikuloendotelna sustava<sup>17</sup> kao npr. BCG (*Bacille Calmette Guérin* tj. atenuirani soj *Mycobacterium tuberculosis* koji se rabi za cijepljenje i kao adjuvans za nespecifičnu imunostimulaciju), *Corynebacterium parvum*, zimozan, glukan, levamisol i sl. Ti nespecifični imunomodulatori povećavaju broj i aktivnost imunokompetentnih stanica. Oni aktiviraju

---

<sup>15</sup> Limfokini su tvari koje otpuštaju senzibilizirani T limfociti u dodiru s antigenom, a imaju različite važne biološke učinke.

<sup>16</sup> Adjuvans je tvar koja nespecifično pojačava imunoreakciju na neki antigen.

<sup>17</sup> Retikuloendotelni sustav (RES) su svi fagociti uključujući fagocite mononuklearnog sustava (monocitima, makrofagi u krvi tj. tkivu, Kupfferove stanice u jetri, mezangijalne stanice u bubregu i mikroglija u mozgu) i granulociti (neutrofili, a manje eozinofili). U novije vrijeme taj se naziv rabi samo za sustav mononuklearnih fagocita.

makrofage, koji pojačano izlučuju različite citokine, te izražavaju molekule MHC II i kostimulacijske molekule B7. Tako oni bolje aktiviraju pomagačke limfocite T<sub>H</sub> čime povećavaju staničnu i humoralnu imunost.

## **V. Restorativna imunoterapija**

Ovim se načinom liječenja pokušava obnoviti nedostatna imunosna funkcija, bez adoptivnoga prijenosa stanica. U tu svrhu upotrebljavaju se, primjerice antagonisti supresijskih utjecaja. Izolacija i kloniranje gena za različite citokine dovela je do mogućnosti njihove lake proizvodnje. U terapiji su iskušeni interferoni, leukini i dr. Osnovni je problem nepoznavanje vrlo složene i višestruke citokinske mreže, pa uz povoljna djelovanja mogu nastati i komplikacije opasne po život bolesnika (Taradi, 2004).

## **2.5. HIPERTERMIJA**

Riječ hipertermija potječe iz staroga grčkoga jezika (grč. *hiper* – više, iznad i grč. *therme* – toplina), a označuje stanje nekoga tijela koje ima veću temperaturu od normalne. Hipertermijom se može definirati svaka temperatura koja podiže temperaturu tijela iznad normalnih vrijednosti, a služi u svrhu izliječenja oboljelog organizma, a to su, uglavnom temperature veće od 41°C.

Prvi pisani podaci o upotrebi hipertermije u liječenju malignih bolesti (tumora) mogu se naći u "prvom" pisanom medicinskom tekstu – Edwin Smith Surgical Papyrus – koji je pronađen u Egiptu, a datira oko 3 000 godina prije Krista. U njemu se spominje upotreba vatre u liječenju raka dojke. Pradavnim Grcima, kao i drugim narodima toga doba upotreba hipertermije, koju su oni nazivali vatra, bila je među važnijim postupcima u liječenju raznih bolesti, kao i u liječenju karcinoma. Poznat je Hipokratov (400 god. pr. Kr) aforizam o uporabi hipertermije (vatre) u liječenju raznih bolesti, pa i tumora, koji na latinskom glasi:

*„Quae medicamenta non sanat, ferum sanat.*

*Quae ferum non sanat, ignis sanat,*

*Quae vero ignis non sanat, insanabilia repotari oportet“.*

Na hrvatskom taj aforizam glasi:

*„Ono što lijekovi ne mogu izliječiti, može željezo (nož, kirurgija).*

*Ono što željezo ne može izliječiti, može vatra (hipertermija).*

*Ono što, pak, vatra ne može izliječiti, uistinu je neizlječivo (smatra se neizlječivim).“*

### *2.5.1. TERAPIJSKI MODALITETI HIPERTERMIIJE*

Hipertermija se veoma rijetko primjenjuje sama za sebe (*per se*). Najčešće se primjenjuje zajedno s radioterapijom (zračenje) i /ili kemoterapijom (citostaticima). Njezina primjena može biti lokalna, regionalna ili sistematska (data po cijelom tijelu).

- Lokalna primjena je najčešća, i to pri liječenju solidnih tumora te površinskih i duboko smještenih.
- Regionalna hipertermija se primjenjuje kad je potrebno zagrijati veću površinu tijela te kad su uz primarni tumorski rast nastale i regionalne metastaze. Lokalna i regionalna hipertermija su redovito iznad 42°C pa do 45°C.
- Sistemskom ili općom hipertermijom naziva se ona kod koje se zagrijava cijelo tijelo. Ona se najčešće primjenjuje pri liječenju leukemije i limfoma ili kada su nastale opće (diseminirane) metastaze. Ona je obično niža 1-2°C od lokalne ili regionalne hipertermije i redovito ne prelazi 42°C.

Lokalna i regionalna hipertermija najčešće se primjenjuju s pomoću ultrazvuka, frekvencije 300 kHz do 3 MHz, ili pomoću mikrovalova frekvencije 433, 915 i 2 450 MHz, ili pomoću radiofrekvencije na valnim dužinama od 8 do 30 MHz ili pomoću kupki u kojima je zagrijana tekućina, obično temperature od 42°C do 45°C i to u liječenju solidnih i uglavnom superficijalnih (površinskih) tumora. Opća hipertermija se provodi pomoću vrućih kupki u kojima može biti vrući zrak ili vosak, ili vruća voda (ili bilo koja vruća tekućina). Kod opće hipertermije treba obratiti pozornost na temperaturu vitalnih organa (mozak, jetra) koji su vrlo osjetljivi na temperaturu iznad 42°C. Naime temperature veće od 42°C mogu na tim organima izazvati ireverzibilna oštećenja.

Sa stajališta kliničke prakse primjena hipertermije u klinici ima dva nedostatka. Prvo, primjena hipertermije u liječenju tumora koji su smješteni duboko u organima i tkivima je neodgovarajuća zbog nedostatnog i neravnomjernog dovođenja topline u tumorsko tkivo. Drugi nedostatak hipertermije je nedovoljna termometrija. Naime, sva tehnička sredstva za mjerenje apsorbirane energije u dubokim tkivima i organima su neodgovarajuća i često teško primjenjiva, jer su invazivna. Ona su jedino primjenjiva za mjerenje apsorbirane energije na površinskim tumorima.

U ovom diplomskom radu primjenjena je lokalna hipertemija s citostatikom (cisplatina) na temperaturama od 43°C, a rezultati su uspoređeni s normalnim fiziološkim uvjetima (37°C).

### 2.5.2. BIOLOŠKI UČINCI HIPERTERMIIJE

Biološki djelotvornom i svrsihodnom hipertermijom smatraju se temperature veće od 41°C, pa do 45°C. Temperature veće od 45°C uzrokuju ireverzibilne procese u normalnim tkivima i stoga se vrlo rijetko primjenjuju u *in vivo* uvjetima. Biološki učinak hipertermije ovisi o stupnju (jačini) temperature te o vremenu izlaganja stanica i tkiva toj temperaturi. Citotoksični učinak temperatura većih od 42°C u izravnoj je korelaciji s jačinom temperature i vremenom djelovanja. Općenito je poznato da se za svaki stupanj (1°C) porasta temperature vrijeme trajanja terapije može skratiti za polovicu kako bi se postigao isti terapijski (citotoksični) učinak tzv. "isoeffect".

Pod utjecajem temperatura većih od 42°C nastaju bitne promjene u staničnoj membrani, citoskeletu, citosolu i jezgri. Budući da svi hipertermijski učinci kreću od stanične membrane, sastav stanične membrane ima bitan utjecaj na stupanj oštećenja i nastanka stanične smrti od hipertermije. Naime membranski fosfolipidi i proteini, pod utjecajem hipertermije, doživljavaju strukturalne i funkcionalne promjene, zbog čega nastaju promjene u membranskoj viskoznosti (gustoći) i fluidnosti (tečnosti). Zbog toga dolazi do promjena u pasivnom transportu, koji se povećava te dolazi do poremećaja u ionskoj izmjeni  $Ca^{2+}$  (koji ulazi u stanicu) i  $K^+$  (koji izlazi iz stanice). Hipertermija uzrokuje znatne promjene svih komponenata citoskeleta (mikrofilamenata, mikrotubularnih i intermedijarnih filamenata) koji inače omogućuju vezu između stanične membrane i jezgre. Mikrofilamenti koji imaju bitnu zadaću u održanju citoplazmatske strukture i tzv. stres filamenata, uslijed djelovanja temperature bivaju oštećeni. Pod utjecajem visokih temperatura mikrotubularni filament koji uz centromere sudjeluju u tvorbi diobenog vretena se raspadaju, zbog čega nema mitoze, pa stanice umiru u fazi mitoze. Intermedijarni filament, koji vežu mikrotubule za staničnu membranu, pod djelovanjem visoke temperature gube strukturu i raspadaju se. Hipertermija uzrokuje i strukturne i funkcionalne promjene citosolnih elemenata (mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i Golgijeva aparata). Lizosomi koji su rezervoar hidrolitičkih enzima i polisomi (poliribosomi) na kojima se odvija sinteza proteina bivaju znatno oštećeni, tj. dolazi do oštećenja lizosomske membrane što dovodi do porasta lizosomskih enzima, a sinteza proteina biva zaustavljena. Mitohondriji postaju zbog visoke temperature natečeni, potom ispucani i nefunkcionalni.

Pod utjecajem visoke temperature na jezgri se događaju i strukturne i funkcionalne promjene dok jezgrica, na kojoj inače teče proces prepisivanja i odmatanja rRNA, djelovanjem hipertermije biva oštećena. Ujedno i sav enzimatski sustav, a posebice DNA i



RNA polimeraze, bivaju pod visokom temperaturom jako zakočene zbog čega stanica propada jer nema sinteze ni popravka DNA kao ni sinteze RNA. Visoke temperature predstavljaju veliki šok za stanicu koja se pokušava zaštititi stvaranjem stresa proteina (**HSP**, prema engl. *heat shock proteins*) koji su smješteni u jezgri ili jezgrići, za koje se pretpostavlja da imaju dvojak ulogu. Prvo, da zaštite stanicu od jakog termičkog oštećenja, naročito oštećenja nastalih na DNA i RNA, a drugo, da omoguće stanici popravak DNA oštećenja.

### 2.5.3. FAKTORI KOJI UTJEČU NA HIPERTERMIJSKI UČINAK

Maligne stanice su osjetljivije *in vivo* na temperaturu od normalnih stanica, i to zbog njihova različita mikrookoliša, koji ih čini osjetljivijim na hipertermiju. Naime, u malignom tkivu često je prisutna acidoza, hipoksija, slaba opskrba prehrambenim tvarima (nutritivna deplecija) te slaba mikrocirkulacija, što sve čini tumorske stanice termosenzitivnijima od normalnih stanica.

Krvne žile u normalnom tkivu (koža, mišić) mogu, djelovanjem hipertermije, povećati protok krvi za faktor 10, u odnosu na početne vrijednosti, dok krvne žile tumora nemaju tu sposobnost. Povećani protok krvi kroz zagrijavano tkivo omogućuje hlađenje tkiva, što za posljedicu ima smanjenje toplinskog učinka. Krvne žile u tumoru, zbog nepotpune anatomske građe (brzi rast), pod djelovanjem hipertermije brzo kolabiraju (popucaju) te kroz tumor nema protoka krvi. Kako nema protoka krvi, nema ni hlađenja tumora te dolazi do nakupljanja toplinske energije, koja izravno ubija tumorske stanice. Zbog neadekvatne prokrvljenosti tumora proizvodi mijene tvari, primjerice mliječna kiselina, ostaju u tumoru, što uzrokuje acidozu i hipoksiju – koje čine tumor osjetljivijim na hipertermiju. Tumorske stanice oko krvne žile su dobro opskrbljene kisikom (normoksija) i nutritivnim tvarima, uz normalan pH – te stanice su osjetljive na zračenje (radiosenzibilne), a otporne na temperaturu (termootporne). Nasuprot tome, u stanicama koje su dalje od krvne žile vlada acidoza (nizak pH), hipoksija i nutritivna deplecija – te stanice su termosenzitivne i radiorezistentne. Stoga je hipertermiju poželjno kombinirati s radioterapijom kako bi se postigao što bolji terapijski učinak, jer hipertermija osim izravnog toksičnog učinka ima i radiosenzibilizirajući učinak (Radačić, 1996).

#### **2.5.4. HIPERTERMIJA I KEMOTERAPIJA**

Većina antitumorskih lijekova pokazuje pospješujući učinak kada se primjeni s temperaturom, s time da je taj učinak jači što je vremenski razmak između pojedinačne primjene kraći, a najizrazitiji (sinergistički) je ako se hipertermija i citostatici daju zajedno jer hipertermija ima i kemosenzibilizirajući učinak. Pospješujući učinak hipertermije na citostatike moguć je zbog toga što temperatura uzrokuje bitne promjene: na staničnoj membrani, promjene u pasivnom transportu, oštećuje enzime popravka, oštećuje makromolekule, oštećuje diobeno vreteno, zaustavlja sintezu proteina i enzima, razara lizosomske membrane. Sva ta oštećenja mogu biti udružena u oštećenja uzrokovana citostaticima i pridonijeti sinergističkom učinku. Oštećenje stanične membrane i porast pasivnog transporta mogu pridonijeti povećanju količine lijekova u stanici, što je i nužno da bi se ostvario sinergistički učinak.

#### **2.6. KEMOTERAPIJA**

Kemoterapija je jedan od oblika liječenja organizma sa zloćudnim tumorom što primjenjuje sistemni pristup u liječenju, što ju bitno razlikuje od kirurgije i radioterapije, koji su ponajprije lokalni oblici liječenja. Termin kemoterapija potječe s početka 19. stoljeća, od Paula Erlicha, a upotrebljen je za liječenje zaraznih bolesti kemijskim sredstvima. Gotovo sve antineoplastične tvari koje se danas upotrebljavaju najdjelotvornije su na stanici u ciklusu. Zbog toga su tumori s velikim dijelom stanica koje rastu (npr. limfomi s visokim stupnjem zloćudnosti) vrlo osjetljivi za antikancerogene tvari. Nasuprot tome, uobičajeni solidni (kompaktni, bez šupljina) tumori (npr. rak debelog crijeva) koji imaju mali dio koji raste, relativno su otporni. U takvim slučajevima strategija liječenja je najprije pokrenuti tumorske stanice iz faze G<sub>0</sub> (faze mirovanja) u stanični ciklus. To se može postići smanjenjem tumorske mase kirurškim odstranjenjem ili zračenjem. Tumorske stanice koje su preživjele nastoje ponovno ući u stanični ciklus i tako postaju primljive za lijekove. Takvo je razmatranje osnovica kombiniranog načina liječenja. Kemoterapiju treba primijeniti što ranije, dok je tumor još malen kao i broj rezistentnih stanica koje nastaju zbog spontanijh mutacija tijekom rasta tumora, a koje su već prisutne u trenutku dijagnoze i početka liječenja kemoterapijom (Tomek, 2000).

Bolji rezultati u kliničkoj kemoterapiji vrlo često se dobivaju primjenom dvaju ili više citostatika radi postizanja sinergističkog citotoksičnog učinka kako bi se spriječile stanice otporne na jedan lijek da razviju otpornost i na druge lijekove u kombinaciji ili uz zračenje.

Pri pravom odabiru postižu se bolji rezultati u smanjenju tumorske mase i remisiji bolesti, a manje je oštećenje i brži oporavak stanica koštane srži i epitelnog tkiva probavnog sustava. Tumorska masa, brzina rasta tumora i doza citostatika glavni su činitelji koji određuju djelotvornost kemoterapije. Da bi se izbjegla znatnija i trajnija oštećenja normalnih brzorastućih tkiva koji imaju kratko vrijeme udvostručenja obujma (hematopoetsko tkivo, sluznica crijeva i folikuli kose), kemoterapija se ne primjenjuje kontinuirano, nego u ciklusima između kojih su pauze potrebne za oporavak zdravog tkiva od eventualnih oštećenja (Tomek, 2000). Uz uobičajenu primjenu citostatika (peroralno, intramuskularno i intravenski) postoje i posebni načini primjene citostatika: instilacija (ubrizgavanje) u tjelesne šuplijne (intraperitonealno, intrapleuralno, intraperikardijalno), instilacija u cerebrospinalnu tekućinu ili subarahnoidalno, splenička (slezenska) infuzija, infuzija u karotidnu ili hepatalnu arteriju.

Postoje 3 načina primjene kemoterapije:

- a) adjuvantna kemoterapija koja se primjenjuje nakon što su operacijom iz organizma uklonjeni primarni tumor i sve makrometastaze i/ili nakon što je markoskopski vidljiva tumorska masa ozračena radikalnom dozom, a cilj joj je iskorijeniti mikrometastatska žarišta bolesti iz kojih se nakon duljeg ili kraćeg razdoblja bez znakova bolesti razvijaju makroskopski lokalni recidivi ili sistemske metastaze,
- b) neoadjuvantna kemoterapija koja predstavlja početni oblik liječenja bolesnika s lokaliziranom malignom bolesti prije kirurškog zahvata ili zračenja, a cilj joj je postići sniženje stadija bolesti ("down staging"), bolji i/ili pošteniji kirurški zahvat i eradikacija (iskorjenjivanje/uklanjanje) mikrometastaza.
- c) primarna kemoterapija se rabi u liječenju bolesnika s diseminiranom bolešću, koji se zbog toga ne mogu uspješno liječiti lokalnim oblicima terapije (Roth, 1996; Tomek, 2000).

U ovom diplomskom radu upotrebljena je intraperitonealna terapija citostatikom cisplatinom.

### 2.6.1. CITOSTATICI

Citostatici (antineoplastici ili antitumorski lijekovi) su kemijski spojevi koji interferiraju metabolizmom stanice, sprječavaju njen rast inhibicijom enzimskih sustava, oštećuju staničnu jezgru i koče diobu stanice. Njihovo djelovanje usmjereno je na tumorske stanice i narušavanjem njihovog staničnog ciklusa, sprječavaju rast ili izazivaju smrt tih stanica u fazi aktivnog rasta. Oni najčešće remete sintezu i/ili funkciju makromolekula (DNA, RNA, proteini) ili funkciju staničnih organela, osobito mikrotubula i diobenog vretena (Tomek, 2000). Određena doza citostatika uvijek uništava određeni postotak (udio) tumorskih stanica. Postotak stanica koje preživljavaju djelovanje citostatika ovisi o njegovoj dozi i on je u većine tumora to manji što je doza citostatika veća. Odnos doze, tj. koncentracije citostatika u mediju i postotka ubijenih zloćudnih stanica određuje se eksperimentalno, u kulturi stanica (Tomek, 2000). Utvrđeno je da se dvostrukim povećanjem doze u eksperimentalnim modelima postiže i deseterostruko veći postotak uništenja zloćudnih stanica, no na žalost dvostruko ili višestruko povećanje standardnih doza povezano je sa znatnim povećanjem i toksičnih nuzdjelovanja, što ugrožava život bolesnika zbog pojava pogibeljne agranulocitoze (granulocitopenije) i trombocitopenije, koje traju tjednima, ako ne i potpune aplazije<sup>18</sup> koštane srži. Kemoterapijom u vrlo visokim dozama eradicirala (iskorijenila) se iz organizma zloćudna bolest, ali se uništila i koštana srž bolesnika, pa se naknadnim presađivanjem alogenične (tuđe) ili autologne (vlastite) koštane srži popravljaju oštećenje mijelopojeze (Roth, 1996; Tomek, 2000).

U posljednje vrijeme, u svakodnevnu kliničku upotrebu ušli su krvotvorni činitelji (faktori) rasta bijele krvne loze (granulocitni koloni-stimulirajući faktor tj. **G-CSF** i granulocitno-makrofagni koloni-stimulirajući faktor tj. **GM-CSF**) koje proizvode stanice koje se normalno nalaze u koštanoj srži (fibroblasti, endotelne stanice, limfociti i makrofagi), a kojima je moguće ubrzati oporavak koštane srži nakon oštećenja citostaticima i tako održati ili čak skratiti razmak između dva ciklusa kemoterapije te se na taj način može održati intezitet doze i osigurati optimalna djelotvornost primijenjene kombinacije citostatika (Tomek, 2000). Kako bi se u što kraćem vremenu postigao najbolji terapijski učinak primijenjuju se kombinacije različitih citostatika čime se postiže sinergistički učinak, brže i selektivnije citotoksično djelovanje na tumorske stanice, a smanjuje se i mogućnost rezistencije tumora na neki citostatik. U liječenju tumora i njihovih metastaza najčešće se koristi kombinirano liječenje citostaticima s drugim metodama, obzirom da se potpuni

---

<sup>18</sup> Aplazija je pojam koji označava izostanak razvoja određenog organa ili tkiva.

terapijski učinak vrlo rijetko postiže primjenom samo jedne od metoda. Uz kemoterapiju primijenjuju se još i radioterapija, imunobioterapija i kirurško liječenje.

Citostatici ostvaruju štetan učinak na stanice u određenoj fazi diobenog ciklusa i to na jedan od 2 načina:

1. ciljano ubijaju stanice u određenoj fazi ciklusa,
2. zaustave prolaz stanica diobenim ciklusom pa dolazi do zastoja ili odgode diobe.

Citostatici se, prema osnovnom načinu biokemijskog djelovanja, mogu svrstati u dvije osnovne skupine:

- a) one koji reagiraju s DNA i utječu na sposobnost replikacije ili transkripcije DNA (npr. alkilirajući agensi, interkalirajući agensi, bleomicini) i
- b) na citostatike koji inhibiraju sintezu DNA blokirajući biosintetske putove purinskih ili pirimidinskih nukleotida (tzv. antimetaboliti).

Ciljne molekule za pojedine citostatike su određeni ključni enzimi, kojih je aktivnost povećana u tumorskim u odnosu na zdrave stanice. Inhibirajući njihovu aktivnost, smanjuje se sinteza DNA. U tumorskoj stanici čitav niz biokemijskih puteva usmjeren je prema konačnom cilju, sintezi DNA (npr. povećana je glikoliza, sinteza pentoza fosfata, sinteza purina i pirimidina, uključujući sintezu ribonukleozid trifosfata i deoksiribonukleozid trifosfata) pa je stoga važan odabir odgovarajućih citostatika koji će na tumorske stanice djelovati selektivno i citotoksično, a u kombinaciji sinergistički. Međutim citostatici uzrokuju oštećenja i zdravih stanica, što se očituje supresijom koštane srži, mukozitisom (upalom sluznice usne šupljine), gubitkom kose i drugim primjerima toksičnosti. Velike doze citostatika nisu toksične samo za koštanu srž, nego i za jetru, srce, pluća, sluznicu probavnih organa, što je često teže rješiv problem od mijelotoksičnosti. Također može doći do rezistencije tumorskih stanica na primijenjeni citostatik koja je uzrokovana genetskim i biokemijskim promjenama tumorske stanice.

Mnogi specifični mehanizmi rezistencije na citostatike kao što su: povećano izbacivanje citostatika iz stanice (djelovanjem P-glikoproteina kao pumpe, P-gp), povećani stanični mehanizam detoksikacije (velika koncentracija glutationa u stanici), mehanizam oporavka (topoizomeraze), promjene u specifičnom mehanizmu prijenosa i brojni drugi pokazuju na koje načine tumorska stanica "zaobilazi" dobro definirane putove napada primijenjenog citostatskog agensa (Roth, 1996).

Istodobna primjena više citostatika omogućuje:

1. postizanje maksimalne smrtnosti tumorskih stanica unutar toksične tolerantnosti za svaki citostatik,
2. pokrivanje šireg područja rezistentnih stanica u heterogenoj tumorskoj populaciji i
3. preveniranje ili usporavanje razvoja novih rezistentnih stanica (Roth, 1996).

Citostatici se razlikuju prema kemijskoj strukturi, prema podrijetlu i prema mehanizmu djelovanja te se stoga dijele u nekoliko skupina, a to su: alkilirajući spojevi, antimetaboliti, citostatski (biljni) alkaloidi, citostatski (antitumorski) antibiotici, hormoni i ostali citostatici.

**Alkilirajući spojevi** obično prenose jednu ili više alkilnih skupina na biološke sustave i oštećuju molekulu DNA stvarajući kovalentne mostove između lanaca. Većina spojeva je bifunkcionalna tj. posjeduju dvije alkilne skupine. Dijele se na skupine: dušični iperiti (ciklofosfamid, klorambucil, klometin, melfalan), etilenimini (TEM-trietilenmelamin, HMM-heksametilmelamin), alkilsulfonati (busulfan), derivati nitrozoureje (lomustin, karmustin, semustin, streptozotocin). Spojevi koji sadrže platinu po mehanizmu djelovanja slični su alkilirajućim spojevima. Najpoznatiji je cisplatina.

**Antimetaboliti** interferiraju sa sintezom nukleinskih kiselina. Dijele se na skupine: antagonisti folne kiseline - inhibiraju pretvaranje folne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu, vežući se na aktivno mjesto enzima dihidrofolat reduktaze (aminopterin, ametopterin), antagonisti purina koji onemogućavaju ugradnju purina u nukleinske kiseline ili se ugrađuju umjesto normalnih purina (6-merkaptopurin kao sumporni derivat hipoksantina, tioguanin, pentostatin), analozi aminokiseline (azaserin analog glutamina), analozi pirimidina koji koče funkciju enzima važnih u sintezi DNA i RNA, a mogu biti i ugrađeni u te nukleinske kiseline (5-fluorouracil, citarabin, azacitidin, floksouridin, difluorodeoksicitidin).

**Citostatski alkaloidi** su dobiveni iz biljaka. Često se nazivaju otrovima diobenog vretena jer su inhibitori mitoze i koče diobu stanice u metafazi. Inhibiraju glikolizu i smanjuju količinu NAD enzima u tumorima i ostalim tkivima koja brzo proliferiraju (vinblastin i vinkristin iz biljke *Vincea rosea* L. (Slika 8), derivati podofilotoksina iz korijena sjevernoameričke biljke *Podophyllum peltatum* L. (Slika 9), takseni iz kore ili iglica drveća porodice *Taxus* (tise), kamptotekin iz kineskog drveta *Camptotheca acuminata* Decne. (Slika 10).

Vinkristin djeluje na protein tubulin koji se inače polimerizira u niti diobenog vretena. Vežanjem vinblastina ili vinkristina na tubulin spriječena je tvorba diobenog vretena i stanica se ne može podijeliti. Derivati podofilotoksina koče djelovanje enzima topoizomeraze II, što onemogućuje popravak lomova u lancima DNA nastalih za vrijeme sinteze novih lanaca DNA što dovodi do smrti stanice. Takseni dovode do polimerizacije i stabilizacije mikrotubula, onemogućujući stvaranje diobenog vretena od podjedinica tubulina. Derivati kamptotekina koče djelovanje enzima topoizomeraze I, što onemogućuje popravak lomova nastalih u pojedinačnim lancima DNA i RNA.



**Slika 8.** *Vinca rosea* L.



**Slika 9.** *Podophyllum peltatum* L.



**Slika 10.** *Camptotheca acuminata* Decne.

**Citostatski antibiotici** dobiveni su iz različitih vrsta bakterija roda *Streptomyces* i imaju izraziti citotoksični učinak (daktinomicin, mitramicin, mitomicin).

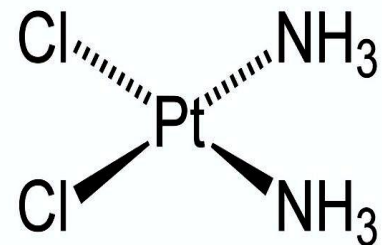
**Hormoni** se koriste u liječenju tumora ovisnih o hormonskoj ravnoteži (glikokortikoidi, estrogeni, progesteroni, analozi oslobađajućeg hormona za gonadotropine, antihormoni).

**Ostali citostatici** (cisplatina, hidroksiurea, mitotan, prokarbazin itd. ) (Roth, 1996; Tomek, 2000).

### 2.6.1.1. Cisplatina

Cisplatina (cis-diamino-dikloroplatinum, cis-DDP) je citostatik koji pripada skupini alkilirajućih sredstava te se primjenjuje u ovom istraživanju. To je kompleksni anorganski spoj građen od platine oko kojeg se vežu četiri liganda, dva atoma klora te dvije molekule amonijaka (Slika 11).

Sintetizirana je 1844. godine od Michel Peyrona, poznata pod nazivom Peyronov klorid.



Slika 11. Strukturna formula cisplatine

Cisplatina ulazi u stanice difuzijom i oštećuje heliks DNA. Budući da je topljiva u vodi, antitumorska aktivnost ovoga spoja teškog metala temeljena je na otpuštanju dvaju kloridnih iona (Cl<sup>-</sup>) u vodenoj otopini stvarajući pozitivno nabijeni reaktivni platina kompleks elektrofilne prirode koji stupa u reakciju s negativno (nukleofilnim) nabijenim makromolekulama u stanici, posebice DNA tvoreći bifunkcionalne kovalentne veze. Pri tome nastaju DNA adukti odnosno DNA-platina kompleksi koji uzrokuju promjene na DNA formaciji i inhibiciju DNA sinteze što naposljetku rezultira apoptozom stanica. Na djelovanje cisplatine su najosjetljivije stanice u S fazi (sinteza novih molekula DNA) staničnog ciklusa. Iako je osnovni mehanizam djelovanja cisplatine inhibicija sinteze DNA, i drugi mehanizmi, poput inhibicija sinteze RNA i proteina te pojačavanje tumorske imunogenosti, mogu biti dio antikancerogenog učinka.



Cisplatina je jedan od najšire i najviše primjenjivanih citostatika, a rabi se isključivo u kombinaciji s drugim citostaticima, posebno s antraciklinima, bleomicinom, vinblastinom, fluorouracilom, ciklofosfamidom i etopozidom. Budući da cisplatina ima neselektivno citotoksično djelovanje, ona inhibira diobu i normalnih stanica, a ne samo tumorskih. Pri tome su najosjetljivije stanice organizma koje se intenzivno dijele, poput matičnih stanica koštane srži. Stoga je primjena cisplatine često ograničena zbog brojnih nuspojava koje može izazvati kod bolesnika kao što su mijelotoksičnost, nefrotoksičnost (oštećenje bubrega), neurotoksičnost (oštećenje živaca), ototoksičnost (oštećenje sluha), mučninu, povraćanje i gubitak kose (alopecija) (Herman i sur., 1988; Roth, 1996). Vrlo je djelotvorna u bolesnika s karcinomom testisa, placentnim koriokarcinomom, karcinomom ovarija, mikrocelularnim karcinomom bronha i karcinomom dojke.

Djelovanje cisplatine ne ovisi o proliferaciji stanica, za razliku od većine alkilirajućih spojeva i antraciklina koji su uglavnom štetniji za proliferirajuće stanice negoli za stanice u mirovanju (Ban i Osmak, 1996). Citostatici, koji su većinom ujedno i mutageni, mogu izazvati promjene u stanicama koje omogućuju tumorskoj stanici boje preživljenje postupka, što na kraju rezultira tumorom otpornim na daljnje liječenje. Povećana koncentracija glutathion transferaza, enzima koji omogućuje vezanje glutathiona i citostatika, kao i metalotioneina, (zaštitnih molekula u stanici), nađena je kod nekih tumorskih stanica otpornih na alkilirajuće spojeve, kao što su cisplatina, melfalan, doksorubicin itd. (Ban i Osmak, 1996). Otpornost na neki citostatik može biti posljedica bolje tolerancije i/ili uspješnijeg popravka oštećenja u DNA, kao što je opaženo kod tumorskih stanica otpornih na cisplatinu ili doksorubicin (Ban i Osmak, 1996).

## **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI KORIŠTENI U ISTRAŽIVANJU

#### 3.1.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

U istraživanju smo koristili visokosrodne miševe istog spola, soja Swiss albino, dobi oko 2 mjeseca, mase 20 – 25 g, iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševe smo držali u kavezima s najviše 5 životinja uz stalnu dostupnost standardne hrane za glodavce (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i vode. Istraživanje smo proveli u skladu s važećim etičkim principima Republike Hrvatske, (Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine broj 135/06, Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine broj 176/04) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) 86-23, 1985).

#### 3.1.2. TUMORSKE STANICE

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) je heterogeni, slabo diferencirani, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti, a izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. U jetri miševa, nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidativnih enzima. Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) održavali smo serijskim presađivanjem vijabilnih stanica intraperitonealno (*i.p.*) svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa u Swiss albino miševima. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravili smo rez i otvorili peritonealnu šupljinu miša te Pasteurovom pipetom uzeli sadržaj iz trbušne šupljine miša s tumorskim stanicama i razrijedili s fiziološkom otopinom (0,9% otopina natrijeva klorida, Pliva) do ciljane koncentracije  $2 \times 10^6$  EAT stanica/0,5 mL. Broj živih stanica odredili smo brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovojoj komorici. Unos EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

### 3.1.3. KVERCETIN

Kvercetin (Quercetin dihydrate 98%, Fluka) smo pripremili otapanjem u 1% etanolu. Neposredno prije uporabe pripravljena je doza kvercetina od 50 mg kg<sup>-1</sup> razrjeđivanjem u vodi, a postotak alkohola je bio manji od 1%.

### 3.1.4. CISPLATINA

U istraživanju je korišten citostatik cisplatina (Cisplatin, Pliva). Za potrebe pokusa, neposredno prije uporabe razrijeđen je u vodi za injekcije u dozi 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>.

## 3.2. METODE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU

### 3.2.1. POSTUPAK SA ŽIVOTINJAMA

Za istraživanje genotoksičnog učinka miševne smo slučajnim odabirom raspodijelili u pokusne skupine s 5 životinja. Sedam i tri dana prije *i.p.* unosa  $2 \times 10^6$  EAT stanica miševima smo injicirali *i.p.* pripravak kvercetina u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup>. Cisplatinu u dozi od 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup> pri normalnoj temperaturi (37°C) i pri uvjetima hipertermije (43°C) injicirali smo 3. dana nakon unosa tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu miša.

Neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu, životinje su uspavane u eksikatoru s dietil eterom. Uzorke stanica krvi, jetre, bubrega i tumora za procjenu genotoksičnog učinka kvercetina, cisplatine te njihovog združenog učinka analizirali smo komet testom 1 sat nakon *i.p.* primjene citostatika cisplatine pri normalnim i hipertermalnim uvjetima.

### 3.2.2. INTRAPERITONEALNA HIPERTERMIJA

Intraperitonealnu hipertermiju napravili smo unosom fiziološke otopine *i.p.* u količini  $2 \times 2$  mL, prethodno zagrijane u vodenoj kupelji na 43°C neposredno prije primjene citostatika. Ovaj postupak smo primjenili na svim pokusnim skupinama neovisno o primjeni citostatika. Jednak postupak primjenili smo i za kemoterapiju pri 37°C pri čemu je fiziološka otopina prethodno zagrijana u vodenoj kupelji na 37°C.

### 3.2.3. KOMET TEST

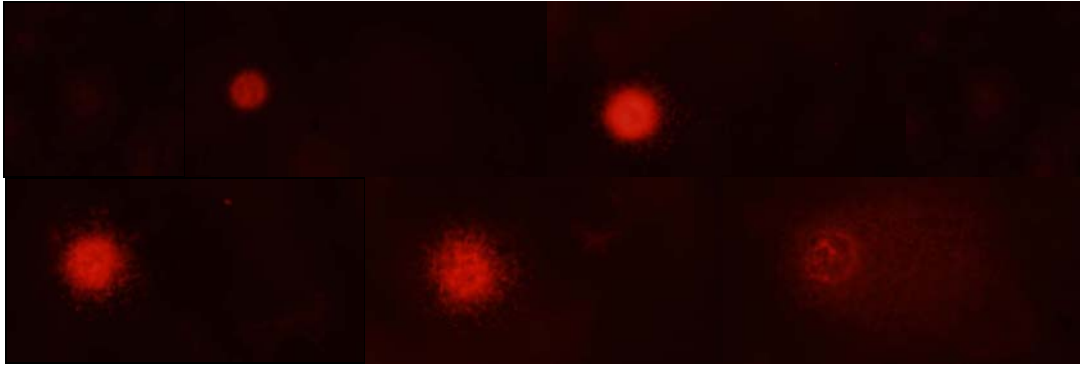
Pripremu preparata krvi, tkiva jetre, bubrega i tumora za komet test napravili smo 1 sat nakon primjene citostatika. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbuha, napravili smo rez na trbušnoj šupljini miša te Pasteurovom pipetom uzeli sadržaj peritonealne tekućine s stanicama tumora. Krv je uzeta Pasteurovom pipetom iz pazušnog spleta krvnih žila miševa. Tkivo jetre i bubrega homogenizirali smo protiskivanjem kroz Miracloth mrežicu (Falcon) u puferu [0,075 M NaCl (Kemika) i 0,024 M Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), pH 7,5], prethodno ohlađenom na 4°C, u omjeru tkiva i pufera 1 : 1. Na brušena predmetna stakalca (Surgipath) nanijeli smo svježe pripremljenu otopinu 1% agaroze normalne točke tališta (Sigma), a potom je prekrili pokrovnicom. Nakon polimerizacije pri temperaturi 20 – 25°C, pokrovnicu smo uklonili sa stakalca, a gel ostrugali. Na osušeno stakalce mikropipetom smo nanijeli 300 µL svježe pripremljene 0,6% agaroze normalne točke tališta, koja je potom prekrivena pokrovnicom i ostavljena na ledu tijekom 10 minuta. Nakon polimerizacije i uklanjanja pokrovnice, nanijeli smo slijedeći sloj sastavljen od 100 µL 0,5% agaroze niske točke tališta (Sigma) pomiješane s 5 µL uzorka (krv, stanice bubrega, jetre ili tumora) koji je potom prekriven pokrovnicom. Nakon slijedećih 10 minuta polimerizacije na ledu, nanijeli smo sloj od 100 µL 0,5% agaroze niske točke tališta i ostavili na ledu tijekom 10 minuta. Nakon polimerizacije, s preparata smo uklonili pokrovnicu. Radi lize staničnih struktura preparate smo uronili u prethodno ohlađeni pufer za lizu [2,5 M NaCl (Kemika), 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), 1% Na-sarkozinat (Sigma), 10 mM Tris-HCl (Sigma), pH 10], uz dodatak 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% DMSO (Kemika) za postizanje ciljane vrijednosti pH, tijekom 2 sata pri temperaturi 4°C.

Postupkom lize uklonili smo stanične i jezgrene membrane te proteine, a DNA uklopljena u gelu ostaje u obliku nukleoida. Iz pufera za lizu, preparate smo premjestili u horizontalnu kadicu za elektroforezu (Life Technologies) sa svježe pripremljenim lužnatim puferom za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), pH 13], što omogućuje odmatanje zavojnice DNA i ekspresiju oštećenja osjetljivih na lužnate uvjete. Preparate smo stavili u smjeru anode, gdje su držani tijekom 20 minuta pri temperaturi 4°C, zaštićeni od svjetla, radi sprječavanja nastanka daljnjih oštećenja DNA. Potom, u jednakim uvjetima tijekom slijedećih 20 minuta proveli smo elektroforezu u električnom polju istosmjerne struje stalne jakosti 300 mA i napona 25 V, pri čemu se slobodni ulomci negativno nabijene molekule DNA kreću kroz agarozni gel od stanične jezgre prema anodi.

Nakon elektroforeze, preparate smo lagano isprali s puferom za neutralizaciju [0,4 M Tris-HCl (Sigma), pH 7,5]. Ispiranje je ponovljeno 3 puta u vremenskim intervalima od 5 minuta. Nakon neutralizacije, preparate smo obojili fluorescentnom bojom etidij-bromid (Kemika) koncentracije  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  i pokrili pokrovnicom. Tijekom 10 minuta, preparate smo držali zaštićene od svjetla, a potom analizirali pod fluorescentnim mikroskopom s ekscitacijskim filterom valne duljine 515 – 560 nm i graničnim filterom valne duljine 590 nm pri povećanju  $400\times$  (Olympus, Japan). Analizirano je 100 stanica po preparatu odnosno ukupno 400 stanica iste vrste iz pojedine pokusne skupine.

Oštećenje DNA i genotoksični učinak kvantificirani smo prema strukturama koje pod fluorescentnim mikroskopom nalikuju na komete sastavljene od glave i repa. Naime, stanice uklopljene u agarozu predmetnog stakalca primjenom neionskog detergenta i soli visoke molarne mase liziraju se oblikujući nukleoide koji su sastavljeni od prstenastih zavojnica DNA povezanih nuklearnim matriksom. Elektroforeza u lužnatim uvjetima rezultira nastankom struktura koje nalikuju na komete. Odlomljeni dijelovi DNA oslobođeni tijekom lize staničnih struktura i odmatanja zavojnice DNA, tijekom procesa elektroforeze slobodno se kreću prema anodi, oblikujući rep kometa. Neoštećena DNA oblikuje glavu kometa i tijekom procesa elektroforeze se zbog velike molekularne mase ne može kretati u agaroznom gelu. Relativni odnos glave i duljine repa odgovara broju lomova DNA unutar stanice (Collins, 2004).

Stanice smo prema duljini repa kometa svrstali u pet razreda, od 0 do 4. Ukoliko komet nije imao repa svrstan je u razred 0, a kometi s najduljim repom svrstani su u razred 4. Ukupni rezultat za pojedinu pokusnu skupinu izračunali smo na slijedeći način:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0)  $+ 1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1)  $+ 2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2)  $+ 3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3)  $+ 4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)]. Sve preparate analizirala je jedna osoba radi izbjegavanja subjektivnosti u procjeni duljine repa kometa.



**Slika 12.** *Kometi različitih razreda*

#### 3.2.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Statistička značajnost rezultata istraživanja testirana je analizom varijance (ANOVA).

## ***4. REZULTATI***



Učinak cisplatine u kombinaciji s kvercetinom u miševa nositelja EAT-a istražili smo praćenjem oštećenja na molekularnoj i staničnoj razini te na cijeloj jedinki 3. dana od unosa EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša i to 1 sat nakon primjene citostatika cisplatine u uvjetima njihove fiziološke tjelesne temperature (37°C) i u uvjetima hipertermije (43°C). Pri tome smo koristili osjetljivu standardnu metodu tzv. alkalni komet testa kojeg su predložili Singh i sur. (1988). Na uzorcima smo izmjerili vrijednosti duljine repa, a izmjereni parametri statistički su obrađeni ANOVOM na nivou značajnosti od  $p < 0,05$ . Mjerenja duljine repa na ukupno 400 stanica iste vrste iz pojedine pokusne skupine iskazali smo u proizvoljnim jedinicama (a.u.) u skali od 0 – 4. Stanice smo prema duljini repa kometa svrstali u pet razreda, od 0 do 4. Ukoliko komet nije imao repa svrstan je u razred 0, a kometi s najduljim repom svrstani su u razred 4. Ukupni rezultat za pojedinu pokusnu skupinu izračunali smo na slijedeći način:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)] te prikazani kao ukupni broj kometa (engl. *total comet score*, **TSC**). Sve preparate analizirala je jedna osoba radi izbjegavanja subjektivnosti u procjeni duljine repa kometa.

Rezultati komet testa na leukocitima (limfocitima) periferne krvi pokazali su značajno povećanje duljine komet repa za cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>), te cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji sa kvercetinom (50 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu pri fiziološkim uvjetima (37°C), a značajnije u uvjetima hipertermije (43°C) (Tablica 2a i 2b). Rezultati komet testa na stanicama bubrega pokazali su značajno povećanje duljine komet repa za kvercetin, cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>), te cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji s kvercetinom (5 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu pri 43°C, dok je pri 37°C od svih skupina kvercetin jedini izuzetak gdje je došlo do slabog, ali statistički neznačajnog povećanja duljine komet repa (Tablica 3a i 3b). Rezultati komet testa na stanicama jetre pokazali su značajno povećanje oštećenja DNA za cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>), te cisplatinu (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u kombinaciji s kvercetinom (5 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu i pri 37°C i pri 43°C (Tablica 4a i 4b). Također, duljina komet repa u stanicama tumora u životinja preventivno obrađenih kvercetinom, ali i terapijske obrade s cisplatinom (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) sa i bez kvercetina bila je povećana u odnosu na kontrolu pri fiziološkim uvjetima (37°C), ali i uvjetima hipertermije (43°C) (Tablica 5a i 5b).

Najniže vrijednosti oštećenja ( $p < 0,05$ ; ANOVA) uočili smo kod primjene kvercetina primjenjenog preventivno kod stanica krvi i stanica jetre, dok su najveće vrijednosti oštećenja DNA uočene kod tumorskih stanica i stanica bubrega također pri primjeni istih skupinama i to prilikom  $37^{\circ}\text{C}$  i  $43^{\circ}\text{C}$  (Tablica 6).

Terapijska primjena same cisplatine ( $5$  i  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) uzrokovala je najveće oštećenje stanica tumora i jetre, a najmanje oštećenje stanica bubrega dok je hipertermička kemoterapija s cisplatinom ( $5$  i  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) najviše oštetila stanice jetre i bubrega, a najmanje stanice krvi i tumora (Tablica 6).

**Tablica 2a.** Rezultati komet testa na stanicama krvi, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te kemoterapije s cisplatinom

Skupina 37°C	Stanice krvi na 37°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	365	35	0	0	0	35	0,09 ± 0,03	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	356	44	0	0	0	44	0,11 ± 0,03	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	35	223	130	9	3	522	1,31 ± 0,14	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	180	174	32	12	2	282	0,71 ± 0,33	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	17	355	24	4	815	2,04 ± 0,08	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	44	154	144	24	34	650	1,63 ± 0,57	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 2b.** Rezultati komet testa na stanicama krvi, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te hipertermičke kemoterapije s cisplatinom

Skupina 43°C	Stanice krvi na 43°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	365	35	0	0	0	35	0,09 ± 0,03	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	300	55	38	7	0	152	0,38 ± 0,31	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	0	40	310	48	2	812	2,03 ± 0,25	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	44	154	144	24	34	650	1,63 ± 0,57	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	17	355	24	4	815	2,04± 0,08	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	0	94	276	18	12	748	1,87 ± 0,30	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 3a.** Rezultati komet testa na stanicama bubrega, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te kemoterapije s cisplatinom

Skupina 37°C	Stanice bubrega na 37°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	378	22	0	0	0	22	0,06 ± 0,03	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	333	54	7	3	3	89	0,22 ± 0,02	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	35	223	139	3	0	510	1,28 ± 0,63	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	128	174	50	24	24	442	1,11 ± 0,37	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	40	310	48	2	812	2,03 ± 0,25	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	2	36	308	36	18	832	2,08 ± 0,08	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 3b.** Rezultati komet testa na stanicama bubrega, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te hipertermičke kemoterapije s cisplatinom

Skupina 43°C	Stanice bubrega na 43°C					TCS	S.V. ± S.D.	Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4			
Kontrola (EAT) (A)	373	27	0	0	0	27	0,07 ± 0,04	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	282	72	46	0	0	164	0,41 ± 0,03	B-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	80	112	20	14	174	890	2,22 ± 0,88	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	8	164	98	64	66	816	2,04 ± 0,40	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	2	64	88	44	202	1180	2,95 ± 0,48	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	0	10	50	40	300	1430	3,58 ± 0,53	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 4a.** Rezultati komet testa na stanicama jetre, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te kemoterapije s cisplatinom

Skupina 37°C	Stanice jetre na 37°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	383	17	0	0	0	17	0,04 ± 0,02	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	354	30	6	4	6	78	0,20 ± 0,12	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	28	165	167	40	0	619	1,55 ± 0,77	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	212	136	40	10	2	254	0,64 ± 0,08	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	8	348	42	2	838	2,10 ± 0,06	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	27	145	154	74	0	675	1,69 ± 0,85	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 4b.** Rezultati komet testa na stanicama jetre, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te hipertermičke kemoterapije s cisplatinom

Skupina 43°C	Stanice jetre na 43°C							Statistički značajna vrijednost p između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	383	17	0	0	0	17	0,04 ± 0,02	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	330	52	10	8	0	96	0,24 ± 0,07	
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	6	42	56	162	134	1176	2,94 ± 0,68	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	8	108	146	104	34	848	2,12 ± 0,05	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	2	50	226	122	1268	3,17 ± 0,01	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	4	56	226	50	64	914	2,29 ± 0,34	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].



**Tablica 5a.** Rezultati komet testa na stanicama tumora, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te kemoterapije s cisplatinom

Skupina 37°C	Stanice tumora na 37°C							Statistički značajno p vrijednost između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	280	107	13	0	0	133	0,33 ± 0,04	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	235	73	29	27	36	356	0,89 ± 0,14	B-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	0	94	276	18	12	748	1,87 ± 0,30	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	0	102	225	67	6	777	1,94 ± 0,68	D-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	40	310	48	2	812	2,03 ± 0,25	E-A →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	2	78	94	110	116	1060	2,65 ± 0,18	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 5b.** Rezultati komet testa na stanicama tumora, u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne obrade kvercetinom te hipertermičke kemoterapije s cisplatinom

Skupina 43°C	Stanice tumora na 43°C							Statistički značajno p vrijednost između grupa (ANOVA test)
	Duljina komet repa (3. dan) <sup>a</sup>							
	0	1	2	3	4	TCS	S.V. ± S.D.	
Kontrola (EAT) (A)	260	127	13	0	0	153	0,38 ± 0,55	
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (B)	100	196	90	14	0	418	1,05 ± 0,48	B-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> (C)	0	8	358	32	2	828	2,07 ± 0,03	C-A →p<0,05
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (D)	10	44	156	104	86	1012	2,53 ± 0,28	D-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> (E)	0	24	316	36	24	860	2,15 ± 0,08	E-A →p<0,05; D-C →p<0,05
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup> (F)	0	0	216	108	76	1060	2,65 ± 0,20	F-A →p<0,05; F-C →p<0,05; F-E →p<0,05

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema TSC izračunu:  $[0 \times N_0$  (broj kometa razreda 0) +  $1 \times N_1$  (broj kometa razreda 1) +  $2 \times N_2$  (broj kometa razreda 2) +  $3 \times N_3$  (broj kometa razreda 3) +  $4 \times N_4$  (broj kometa razreda 4)].

**Tablica 6.** Komet test na stanicama krvi, bubrega, jetre i tumora u miševa s Ehrlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne imunoterapije pripravcima flavonoida kvercetina te kemoterapije cisplatinom

Skupina	Temperatura 37°C				Temperatura 43°C			
	Stanice krvi	Stanice bubrega	Stanice jetre	Stanice tumora	Stanice krvi	Stanice bubrega	Stanice jetre	Stanice tumora
Kontrola (EAT)	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,33 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,38 ± 0,55
Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup>	0,11 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,12	0,89 ± 0,14*	0,38 ± 0,31	0,41 ± 0,03*	0,24 ± 0,07	1,05 ± 0,48*
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup>	1,31 ± 0,14*	1,28 ± 0,63*	1,55 ± 0,77*	1,87 ± 0,30*	2,03 ± 0,25*	2,22 ± 0,88*	2,94 ± 0,68*	2,07 ± 0,03*
Cisplatina 5 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup>	0,71 ± 0,33*	1,11 ± 0,37*♦	0,64 ± 0,08*♦	1,94 ± 0,68*	1,63 ± 0,57*	2,04 ± 0,40*	2,12 ± 0,05*♦	2,53 ± 0,28*♦
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup>	2,04 ± 0,08*	2,03 ± 0,25*	2,10 ± 0,06*	2,03 ± 0,25*	2,04 ± 0,08*	2,95 ± 0,48*	3,17 ± 0,01*	2,15 ± 0,08*♦
Cisplatina 10 mg kg <sup>-1</sup> + Kvercetin 50 mg kg <sup>-1</sup>	1,63 ± 0,57*♦	2,08 ± 0,08*♦	1,69 ± 0,85*♦•	2,65 ± 0,18*♦•	1,87 ± 0,30*♦•	3,58 ± 0,53*♦•	2,29 ± 0,34*♦•	2,65 ± 0,20*♦•

<sup>a</sup> Swiss albino miševi su preventivno obrađeni s kvercetinom u dozi 50 mg kg<sup>-1</sup> 7 i 3 dana prije *i.p.* unosa 2×10<sup>6</sup> EAT stanica. Cisplatina je primijenjena *i.p.* u dozi 5 ili 10 mg kg<sup>-1</sup> 3. dana nakon unosa EAT stanica. Oštećenja stanica određena su 1 sat nakon primjene citostatika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (S.V. ± S.D.) pojedine skupine životinja ( $n = 4$ ) prema izračunu:  $[0 \times N_0 \text{ (broj kometa razreda 0)} + 1 \times N_1 \text{ (broj kometa razreda 1)} + 2 \times N_2 \text{ (broj kometa razreda 2)} + 3 \times N_3 \text{ (broj kometa razreda 3)} + 4 \times N_4 \text{ (broj kometa razreda 4)}]$ .

\* Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (ANOVA).

♦ Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatina 5 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

• Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu Cisplatina 10 mg kg<sup>-1</sup> (ANOVA).

## ***5. RASPRAVA***

Standardne metode liječenja tumora obično zahtjevaju upotrebu više različitih kemoterapeutika kako bi se spriječila križna otpornost tumorskih stanica, što doprinosi njihovoj većoj toksičnosti, a s druge strane daju lošiji ishod liječenja. Svojestvo kemoterapije da narušava cjelovitost stanica iskorišteno je u svrhu liječenja tumora, što je dovelo do razvoja čitavog niza kemoterapijskih lijekova s različitim mehanizmima djelovanja.. Stoga se u novije vrijeme u liječenju malignih bolesti sve više uvode metode združene kemoterapije koje za cilj imaju povećani protutumorski odgovor i smanjenje toksičnosti na zdrave stanice. Usporedno s time, pokazalo se nužnim pronaći tvari s zaštitnim učinkom tzv. citoprotektore, koji nisu toksični za zdrave stanice i ne umanjuju pozitivne učinke terapije, a istovremeno umanjuju štetne učinke kemoterapije izazvane u zdravim stanicama i tkivima. Upotreba biljaka i biljnih pripravaka u liječenju i prevenciji razvoja raznih bolesti poznate su u narodnoj i klasičnoj medicini od davnina pa se stoga prirodno nametnula ideja za detaljnijim istaživanjem istih u zaštiti od štetnih učinaka kemoterapije.

Flavonoidi kao polifenolni spojevi zastupljeni u biljkama i biljnoj prehrani s dokazanim antioksidativnim svojstima predstavljaju potencijalno prirodne, lako dostupne i netoksične kemoprotektore. Tome u prilog govore i mnogobrojna istraživanja flavonoida koja se temelje na istraživanju kemopreventivnih i protutumorskih učinaka na modelu miša (Bašić i sur., 1998; Oršolić i sur., 2003b; Oršolić i sur., 2004b; Oršolić i Bašić, 2005b) budući da je imunosni sustav miševa-nositelja tumora stalno oslabljen i oštećen (Oršolić i Bašić, 2007). Novi pristup u obradi tumora temeljen na primjeni kemoimunoterapije i hipertermije može prouzročiti visoku učinkovitost na stanice tumora te nisku toksičnost na zdrave imunosne stanice i cjelokupni organizam nositelja tumora. Stoga smo ovim diplomskim radom pokušali utvrditi moguće kemopreventivno, citotoksično i genotoksično djelovanje flavonoida kvercetina u preventivnoj obradi s cisplatinom na modelu miša nositelja Ehrlichova ascitesnog tumora u normalim (37°C) i hipertermalnim (43°C) uvjetima praćenjem oštećenja molekule DNA na normalnim (leukociti krvi, bubreg, jetra) i tumorskim stanicama metodom alkalnog komet testa koja omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine, te ukriženog povezivanja između molekula DNA-DNA i DNA-proteini.

Mjerenjem duljine komet repa koja je u pozitivnom suodnosu s duljinom odlomljenih ulomaka DNA napravljena je procjena oštećenja DNA budući da su duljina repa i oštećenja DNA u razmjernom odnosu.

Poznato je da kemoterapija osim što uzrokuje oštećenja tumorskih stanica, oštećuje i zdrave stanice posebice stanice limfoidnog i hematopoetskog sustava uslijed djelovanja reaktivnih radikala kisika (ROS), dušika (RNS) i slobodnih radikala koji inače nastaju

endogeno kao proizvodi aerobnog metabolizma te aktivnošću stanica imunološkog sustava. Slobodni radikali i/ili reaktivni radikali kisika (ROS) osim toksičnih učinaka kao što je oksidativni stres koji uzrokuje bolesti krvožilnog sustava, karcinom i starenje, imaju i važnu ulogu kod obavljanja važnih fizioloških funkcija kao što su: proizvodnja energije u stanici, sinteza biološki esencijalnih spojeva, fagocitoza i prijenos signala.

Glavna uloga antioksidansa je prevencija oksidativnih oštećenja biološkog sustava, bez utjecaja na fiziološke funkcije, a da bi se postiglo takvo selektivno djelovanje antioksidansa potrebno je potpuno razumjevanje mehanizama i dinamike toksičnih učinaka slobodnih radikala i/ili reaktivnih vrsta kisika (ROS). Stanice stoga, kako bi se obranile od štetnog djelovanja oksidativnog stresa, posjeduju vlastite obrambene mehanizme koji se sastoje od antioksidativnih enzima (glutation (GSH), melatonin,  $\text{Cu}_2$ ,  $\text{Zn}_2$  i Mn superoksid dismutaza (SOD), katalaza i dr.) i neenzimskih antioksidansa koji mogu biti uneseni ili sintetizirani u organizmu.

Antioksidativni učinak kvercetina zasniva se na supresiji nastanka ROS i RNS, te aktivaciji i zaštiti antioksidativne obrane organizama. Zaštitni učinak kvercetina vidljiv je kod stanica krvi i jetre obrađenih cisplatinom (5 i 10  $\text{mg kg}^{-1}$ ) s kvercetinom (50  $\text{mg kg}^{-1}$ ) gdje je uočeno značajno smanjenje razine oštećenja DNA pri 37°C i 43°C u odnosu na upotrebu same cisplatinu (5 i 10  $\text{mg kg}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ; ANOVA) (Tablica 2a, 2b, 4a i 4b). Ovi rezultati u skladu su sa s istraživanjima Benković i sur. (2009).

U terapijskoj primjeni istih doza cisplatinu u kombinaciji s kvercetinom kod stanica tumora uočili smo naprotiv povećanje oštećenja molekula DNA pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima. Rezultati komet testa na stanicama bubrega potvrđuju povećanu genotoksičnost cisplatinu (10  $\text{mg kg}^{-1}$ ) u kombinaciji s kvercetinom pri fiziološkim i hipertermalnim uvjetima što je u suprotnosti sa rezultatima na stanicama krvi i jetre gdje smo uočili pozitivan učinak kvercetina u kombinaciji s cisplatinom (5 i 10  $\text{mg kg}^{-1}$ ) na smanjenje oštećenja molekula DNA (Tablica 6). Iz ovoga je vidljivo da kvercetin kao antioksidans upotrebljen kao dodatak u kemoterapiji povećava učinkovitost protutumorskih lijekova i/ili slabe njihov štetni učinak na okolno zdravo tkivo, sprječavajući apoptozu imunskih stanica i povećavaju otpornost samog organizma što ujedno potvrđuju i drugi autori (Oršolić i Bašić, 2005a; 2007; Shen i sur., 2008). Iz istraživanja Shena i sur. (2008) vidljivo je da kvercetin u kombinaciji s hipertermijom može značajno pojačati poništavajuće djelovanje MDR na doksorubicin u rezistentnim staničnim linijama ljudske mijeloidne leukemije (K562/A) što ukazuje da kvercetin primjenjen zajedno s hipertermijom ima sinergistički učinak na apoptozu.

Možemo pretpostaviti da je do velikih oštećenja u stanicama bubrega došlo uslijed primjene većih doza citostatika i spore apsorpcije kvercetina i/ili mogućeg prooksidativnog djelovanja kvercetina. Osim toga poznato je da cisplatina najveća oštećenja prouzrokuje na stanicama bubrega i jetre slabeći njihovu funkcionalnu sposobnost što je potvrđeno i našim istraživanjima te drugim istraživanjima provedenim u ovom laboratoriju (Oršolić i sur. 2008; Brozović i sur. 2009)

Često sposobnost kemoterapeutika da potakne apoptozu u tumorskim stanicama ovisi o sposobnosti tumorskih stanica da proizvede ROS, budući da je utvrđeno da je slaba razina ROS-a povezana s ekspresijom P-gp proteina. Utvrđeno je da tumori koji su otporni na lijekove imaju nisku razinu ROS-a i visoku razinu glutationa (GSH) (Maeda i sur., 2004; Morales i sur., 2005) te povećanu aktivnost antioksidativnih enzima npr. katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD) i drugi (Anuszewska i sur., 1997). Brojna istraživanja ukazuju da flavonoidi, posebice kvercetin mogu inhibirati ekspresiju P-gp pumpe te pojačati učinkovitost citostatika na tumorske stanice, sprječavajući njegovo aktivno izbacivanje iz stanice (Oršolić i sur. 2008).

Poznato je da je osjetljivost stanica izravno razmjerna njihovoj reproduktivnoj aktivnosti, a obrnuto razmjerna stupnju diferencijacije. Matične stanice hematopoetskog sustava intenzivno se dijele tijekom procesa hematopoeze i uslijed toga vrlo su osjetljive na djelovanje citostatika. Rezultati ukazuju da je broj oštećenja stanica krvi manji primjenom kemoterapije s cisplatinom sa i bez upotrebe kvercetina pri 37°C, nego kod hipertermičke kemoterapije istim spojevima (Tablica 2a i 2b). Razlog tome može biti jednim dijelom zaštitnog djelovanja kvercetina s jedne strane koji pokazuje bolju bioraspoloživost i apsorpciju u organizmu pri fiziološkim uvjetima, nego pri hipertermalnim uvjetima (43°C). S druge strane, primjena visoke doze kemoterapeutika uz hipertermiju dovodi do jakog oštećenja stanica periferne krvi i propadanja istih. Slične rezultate uočili smo i na drugim normalnim stanicama (bubreg, jetra) te na tumorskim stanicama (Tablica 6) što ukazuje da sinergističko djelovanje cisplatine i hipertermije pri istovremenoj primjeni ima najveću protutumorsku učinkovitost (Herman i sur., 1988). Taj učinak je tim jače izražen što je vremenski razmak između pojedine primjene citostatika kraći.

Također brojni autori dokazali su da kvercetin djeluje kao senzibilizator hipertermije inhibiranjem sinteze proteina stresa 27, 70 i 72 (HSP27, HSP70, HSP72) te specifično smanjuje razvoj termotolerancije u različitim linijama tumorskih stanica (primjerice karcinoma jajnika i cerviksa, tumora prostate, mijeloidne leukemije, raka pluća i grkljana, melanoma) pri čemu najučinkovitije djeluje pri niskom pH (Asea i sur., 2001; Piantelli i sur.,

2001; Wachsberger i sur., 2003; Jakubowicz-Gil i sur., 2002, 2005; Shen i sur., 2008). Budući da su mnogi tumori prilagođeni na rast pri niskom pH i mogu biti otporni na široku raznolikost terapijskih modaliteta, inhibicijom ekspresije termotolerancije s kvercetinom može se ne samo pojačati odgovor na hipertermiju, već i na zajedničku upotrebu terapija kao što su kemoterapija i zračenje. Nadalje, utvrđeno je da kvercetin značajno štiti hematopoetske stanice od toksičnih metabolita cisplatine i u fiziološkim i u hipertermalnim uvjetima što ukazuju na moguću primjenu kvercetina u sprječavanju imunocitopenije mijeloidnih i limfoidnih stanica prouzročene kemoterapeutičima što je u skladu s podacima Oršolić i Bašić (2005a) u kombinaciji propolisa i epirubicina. Sprječavanje imunosupresije (odnosno potiskivanja i suzbijanja imnuoreakcije) kvercetinom je ujedno važno i u sprječavanju širenja bakterijskih i virusnih infekcija kao posljedica oslabljene imunološke reaktivnosti domaćina nakon obrade kemoterapeutičima.

Najveće vrijednosti oštećenja DNA uočene su kod tumorskih stanica i stanica bubrega pri primjeni kvercetina s cisplatinom (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) u odnosu na samu cisplatinu i kontrolu (EAT) u normalnim i hipertermalnim uvjetima što ukazuje na mogući prooksidativni učinak kvercetina (Tablica 6). Kod tih stanica ističe se sinergističko djelovanje kvercetina združenog s cisplatinom što je vidljivo u boljem protutumorskom i genotoksičnom djelovanju na tumorske stanice, a nepovoljnom djelovanju na stanice bubrega u odnosu na samu cisplatinu i kontrolu (EAT). Takvo izravno protutumorsko djelovanje kvercetina i cisplatine temelji se na indukciji procesa apoptoze u tumorskim stanicama na što ukazuju i drugi autori (Choi i sur., 1999; Oršolić i sur., 2003b). Stoga bi u budućim istraživanjima trebalo napraviti doza-ovisni učinak cisplatine u kombinaciji s kvercetinom budući da je dokazano da kvercetin, ovisno o dozi, utječe na ulazak citostatika u stanice u rezistentnim tumorskim staničnim linijama modelirajući aktivnost P-gp pumpe (Scambia i sur., 1994).

U preventivnoj obradi stanica jetre s kvercetinom kemoterapija s cisplatinom (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) rezultirala je značajnim smanjenjem oštećenja DNA u odnosu na upotrebu same cisplatine (Tablica 4a i 4b) i pri 37°C i pri 43°C što nam ukazuje da kvercetin može imati zaštitni učinak na jetru (hepatoprotektivni učinak) odnosno smanjiti toksičnost kemoterapeutika sudjelujući u modifikaciji metaboličke aktivacije i/ili detoksifikacije kemoterapeutika modulacijom enzima jetre faze I i faze II. Kvercetin primijenjen preventivno *i.p.* tijekom 7. i 3. dana prije unosa EAT stanica u dozi od 50 mg kg<sup>-1</sup> kod svih vrsta stanica nije pokazao genotoksične učinke što je u skladu s rezultatima istraživanja Benković i sur. (2009).



Mehanizmi međudjelovanja kvercetina, a time i drugih flavonoida i citostatskih protutumorskih lijekova nisu posve utvrđeni. Poznato je da kvercetin može imati antioksidativne i prooksidativne sposobnosti, ovisno o sustavu (koncentraciji i izvoru slobodnih radikala u stanici, odnosno redoks stanju stanice) i primjenjenoj dozi što je utvrđeno istraživanjem na životinjskim modelima i na kulturama stanica (Middleton i sur., 2000; Rice-Evans, 2001; Yen i sur., 2003; Akbas i sur., 2005). Prooksidativni učinci kvercetina u vezi su sa unutarstaničnom količinom glutaciona (GSH) (koji je važan unutarstanični reducens tj. antioksidans koji uklanja radikale nastale zbog djelovanja citostatika); smanjena količina glutaciona (GSH) ubrzava citotoksičnost citostatika poticanjem apoptoze i oksidativnog oštećenja molekule DNA u tumorskim stanicama, dok pojačana sinteza glutaciona (GSH) i superoksid dismutaze (SOD) nakon obrade životinja flavonoidima pridonosi zaštiti normalnih stanica od posljedica radikala prouzročenih kemoterapeutikima (Oršolić i Bašić, 2007). Antioksidativna svojstva kvercetina vezana su uz mogućnost stvaranja stabilnih spojeva nakon reakcije vezanja slobodnih radikala.

Iako mehanizmi učinaka hipertermije nisu u potpunosti razjašnjeni, iz naših rezultata vidljivo je da je hipertermija povećala osjetljivost tumorskih stanica na cisplatinu (kemosenzitacijski učinak). Temeljem dobivenih rezultata sinergizam između cisplatine i kvercetina uz hipertemiju na duljinu komet repa mogao bi se temeljiti na:

1. antioksidativnim svojstvima kvercetina,
2. inhibiciji prooksidativnih enzima (ciklooksigenaza, lipooksigenaza, ksantin oksidaza) kvercetinom što dovodi do inhibicije angiogeneze te odlaska stanice u apoptozu,
3. inhibiciji prijenosa signalnih molekula,
4. inhibiciji tumorskih onkogeni i aktivaciji ekspresije tumor-supresor gena,
5. poticanju procesa apoptoze/nekroze u tumorskim stanicama,
6. promjeni redoks stanja stanica tumora,
7. inhibiciji angiogeneze,
8. povećanju citotoksičnosti cisplatine u rezistentnim stanicama tumora,
9. dokidanju rezistencije na cisplatinu inhibicijom pojačane ekspresije membranske P-glikoproteinske (P-gp) pumpe kvercetinom kako bi se omogućilo vraćanje stanica koje su razvile križnu otpornost na fazu osjetljivu na lijekove,
10. sinergističkom djelovanju kvercetina i kemoterapeutika na topoizomerase I i II koje se pretvaraju u snažne toksine za DNA i potiču apoptozu kada je razina oštećenja DNA visoka,

11. inhibiciji metaloproteinaza, telomeraza, ornitin dekarboksilaza i brojnih kinaza (protein tirozin kinaza, cAMP-ovisnih protein kinaza, ciklin-ovisnih kinaza, mitogen aktiviranih protein kinaza),
12. inhibiciji aktivnosti transkripcijskog čimbenika – nuklearnog faktora kappa B (NFκB),
13. modulaciji detoksifikacije enzima faze I i II,
14. stimulaciji imunološkog sustava kvercetinom radi odbacivanja tumora koji se prvenstveno temelji na aktivaciji makrofaga, a preko njih na stimulaciji T- i B-limfocita i NK stanica,
15. modulaciji steroidnih hormona (fitoestrogenska aktivnost),
16. inhibiciji aktivacije mitotskih signala,
17. smanjenju izražavanja proteina stresa (HSP) u tumorskim stanicama što potiče sinergističko djelovanje flavonoida i hipertermije na apoptozu,
18. hipoksiji, posebice na niskom pH koji se odnosi na povećanu proizvodnju mliječne kiseline i slab protok krvi povećavajući osjetljivost tumorskih stanica na citostatik i hipertermiju,
19. inhibiciji prijenosa mliječne kiseline kvercetinom što povećava osjetljivost na hipertermiju (Oršolić i Bašić, 2007; Oršolić i sur., 2008a,b).

Prema navedenim podacima očito je da postoje brojne međureakcije između imunskih, hematopoetskih i tumorskih stanica. Znatno smanjenje genotoksičnosti cisplatine u kombinaciji s kvercetinom na normalne stanice navode na zaključak da kvercetin može smanjiti posljedice toksičnosti citostatika te pojačati stimulaciju imunskih stanica koje usporavaju rast tumora, vode njegovom odbacivanju i uništenju.

Brojni podaci ukazuju da različite hranidbene tvari, biljna hrana koja sadrži polifenole kao što su flavonoidi, folne kiseline i druge sastavnice pokazuju brojne biološke aktivnosti uključene u terapiju tumora (Kuhlmann i sur., 2003; Lee i sur., 2003; Oršolić i Bašić, 2005a; Oršolić i sur., 2006; Nadova i sur., 2007). Prema tome možemo zaključiti da kvercetin združen s cisplatinom može povećati protutumorski učinak kemoterapeutika što sugerira moguću kliničku uporabu u cilju povećanja imunosti organizma te smanjenja štetnih učinaka kemoterapeutika na normalne stanice i tkiva.

## ***6. ZAKLJUČAK***

Temeljem istraživanja učinaka hipertermije, citostatika cisplatine i flavonoida kvercetina na zdrave stanice krvi (leukociti/limfociti), bubrega, jetre i na tumorske stanice u miša nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora došli smo do slijedećih zaključaka:

- I. Rezultati dobiveni komet testom ukazuju na zaštitni učinak flavonoida kvercetina od posljedica nastalih primjenom citostatika cisplatine na zdrave stanice (leukociti/limfociti krvi, bubreg, jetra) te pojačani toksični učinak na stanice tumora.
- II. Citotoksični i genotoksični učinak citostatika cisplatine u kombinaciji sa kvercetinom ovisan je o primijenjenoj dozi i izloženosti učinku hipertermije.
- III. Citotoksični i genotoksični učinak citostatika cisplatine sa i bez upotrebe kvercetina na stanice tumora veći je što je veće doza citostatika cisplatine.
- IV. Upotreba hipertermije s kemoimunoterapijom dodatno povećava toksični učinak citostatika cisplatine ovisno o dozi na stanice tumora, a smanjuje toksičnost na zdrave imunosne odrednice i cjelokupni organizam nositelja tumora.
- V. Primjena flavonoida kvercetina preventivno *i.p.* tijekom 7. i 3. dana ne uzrokuje genotoksična oštećenja kod stanica krvi, jetre, bubrega pri 37°C, te kod stanica krvi i jetre pri 43°C u odnosu na kontrolnu skupinu (EAT).
- VI. Daljnjim istraživanjima trebalo bi detaljnije istražiti doza-ovisni učinak citostatika cisplatine u kombinaciji s kvercetinom i pretpostavljene mehanizme djelovanja flavonoida kvercetina, citostatika cisplatine i hipertermije na modelu miša.

## ***7. LITERATURA***

1. Abd el Hady FK, Hegazi AG (2008) Egyptian propolis: Anti inflammatory effect. In: Oršolić N, Bašić I, editors, Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine. Ethnopharmacology. India: Trivandrum: Research Signpost: 106
2. Akbas SH, Timur M, Ozben T (2005) The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. *J Surg Res* 125: 49-55
3. Anuszevska EL, Gruber BM, Koziorowska JH (1997) Studies on adaptation to Adriamycin in cells pretreated with hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 54: 597-603
4. Arts ICW, Hollman PCH (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*;81(suppl): 317S-25S
5. Asea A, Ara G, Teicher BA, Stevenson MA, Calderwood SK (2001) Effects of the flavonoid drug quercetin on the response of human prostate tumours to hyperthermia in vitro and in vivo. *Int J Hyperthermia*. 17(4): 347-56
6. Azuma I, Jolles G (1987) Immunostimulants. Now and Tomorrow. Proc French-Japan Joint Conference on Immunomodulators, Paris, 1986. Springer-Verlag, Berlin
7. Ban J, Osmak M (1996) Načela proliferacije tumora .U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 37-55
8. Bašić M, Malenica B, Eljuga D (1996) Biologija metastaziranja tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 99-124
9. Bašić I, Oršolić N, Tadić Z, Macedo Fereire Alcici N, Brbot Šaranović A, Bendelja K, Krsnik B, Rabatić S (1998) Antimetastatic effect of propolis, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid on mammary carcinoma of CBA mouse. 17<sup>th</sup> International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brazil 1: 63-75
10. Benković V, Horvat Knežević A, Đikić D, Lisičić D, Oršolić N, Bašić I, Kopjar N (2009) Radioprotective effects of quecetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol* 60: 129-138
11. Bevanda M (2006) Disertacija: Učinak hipertermičke kemoimunoterapije na karcinomatizu peritoneuma u miševa. Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru
12. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186: 343-55
13. Bors W, Michel C, Stettmaier K (2001) Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods Enzymol* 335: 166-180
14. Brown JP (1980) A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat Res* 75(3): 243-277

15. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 87(4): 595-600
16. Cheng IF, Breen K (2000) The ability of four flavonoids, baiciclein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* 13(1): 77-83
17. Choi YH, Lee WY, Nam SY, Choi KC, Park YE (1999) Apoptosis induced by propolis in human hepatocellular carcinoma cell line. *Int J Mol Med* 4(1): 29-32
18. Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 26(3): 249-261. Review.
19. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu Jp, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vander-Berghe V (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat Prod* 61: 71-6
20. Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1(6): 569-590
21. Cotelle N, Bernier JL, Hénichart JP, Catteau JP, Gaydou E, Wallet JC (1992) Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radical Biol Med* 13: 211-9
22. Cushnie TPT, Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26 (5): 343–356
23. Čulo F (2000) Imunosno prepoznavanje tumorske stanice. U: Šamija M i suradnici, ur. *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 29-40
24. Damre AS, Gokhale AB, Phadke AS, Kulkarni KR, Saraf MN (2003) Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*. *Fitoterapia*. 74: 257-61
25. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S, (1992) Immunomodulatory action of propolis IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivite. *Vaccine*. 10: 817-823
26. Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Bankova V, Nikolov N, Popov S (1991) Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*. 22: 155-162.
27. Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS (1992) Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 44: 1603-8
28. Ewald C, Fjelkner-Modig S, Johansson K, Sjöholm JA, Åkesson B (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chem*. 64: 231-235

29. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 416: 123-9
30. Frankel EN (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341: 1103-1104
31. Fischer G, Vidor T (2008) Propolis as an immune system modulator substance. In: Oršolić N, Bašić I, editors, *Scientific evidence of the use of the propolis in ethnomedicine. Ethnopharmacology*. India: Trivandrum: Research Signpost: 133-148
32. Frankel EN, German JB, Kinsella JE, Parks E, Kanner J (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-7
33. Friedman M, Kazazić S, Kezele N, Klasinc L, McGlynn S P, Pečur S, Pryor WA (2000), Role of nitrogen oxides in ozone toxicity. *Croat Chem Acta* 73: 1141-51
34. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 61: 549-54
35. Galati G, O'Brien PJ (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorbtion, Metabolism, and Bioactivity*. *Free Radic Biol Med* 37(3): 287-303
36. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicol* 177: 91-104
37. Hadden JW, Spreafico F, Yamamura Y, Austen KE, Dukor P, Masek K (1989) *Advances in Immunopharmacology 4. Proc IVth Int Conf Immunopharmacology, 1988, Osaka. Pergamon Press, Oxford*
38. Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-4
39. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 33: 601-17
40. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med* 16: 845-50
41. Hausmann RE, Cooper GM (2004): *Rak. U: Hausmann RE, Cooper GM, ur. Stanica – molekularni pristup. Zagreb: Medicinska naklada, 631-673*



42. Hegarty VM, May HM, Khaw KT (2000) Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr* 71(4): 1003-1007
43. Heilmann J, Merfort I, Weiss M (1995) Radical scavenger activity of different 3',4'-dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence. *Planta Med* 61: 435-8
44. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya D J (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584
45. Herman TS, Teicher BA, Chan V, Collins LS, Kaufmann ME, Loh C (1988) Effect of Hyperthermia on the Action of cis-Diamminedichloroplatinum(II), Rhodamine 123 [Tetrachloroplatinum(II)], Rhodamine 123, and Potassium Tetrachloroplatinate in Vitro and in Vivo. *Cancer research* 48: 2335-2341
46. Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S (2003) Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5): 2699–706
47. Jagetia GC, Reddy KT (2005) Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. *Life Sci* 77(7): 780-794
48. Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Gawron A, Kandefor-Szerszeń M (2002) The effect of cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp72 expression. *Pol J Pathol.* 53(3): 133-7
49. Jakubowicz-Gil J, Pawlikowska-Pawlega B, Piersiak T, Pawelec J, Gawron A (2005) Quercetin suppresses heat shock-induced nuclear translocation of Hsp72. *Folia Histochem Cytobiol.* 43(3): 123-8
50. Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A (2002) Quercetin, apoptosis, heat shock. *Biochem Pharmacol.* 64(11): 1591-5
51. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G (2005) Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 81(suppl): 313S-6S
52. Josipović P, Oršolić N (2008) Citotoksičnost polifenolnih/flavonoidnih spojeva u kulturi leukemijskih stanica. *Arh Hig Rada Toksikol* 59: 299-308
53. Jukić S, Jukić D, Nola M, (2002) Neoplazme (novotvorine). U: Jukić S, Damjanov I, ur. *Opća patologija*, Zagreb: Medicinska naklada, 129 161
54. Juretić A (2000) Metastaziranje i angiogeneza. U: Šamija M i suradnici, ur. *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 41-45
55. Justesen U, Knuthsen P (2001) Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem.* 73: 245-50

56. Kandaswami G, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E (1993) Ascorbic acid enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Drug* 4: 91-6
57. Kawada K, Seki S, Inoue M, Kuroki T (1998) Effect of Antioxidants, Resveratrol, Quercetin, and N-Acetylcysteine, on the Functions of Cultured Rat Hepatic Stellate Cells and Kupfer Cells. *Hepatology* 27: 1265-1274
58. Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL (2002) Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53(4): 268-74
59. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K (1998) Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention.* 22: 506-15
60. Kuhlmann O, Hofmann HS, Muller SP, Weiss M (2003) Pharmacokinetics of idarubicin in the isolated perfused rat lung: effect of cinchonine and rutin. *Anticancer Drugs* 14(6):411-416
61. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2000) *Novotvorine. U: Kumar V, Cotran, Robbins SL, Osnove patologije – prema petom američkom izdanju, Zagreb: Školska knjiga, 171- 215*
62. Kujundžić M (1988) *Magistarski rad: Liječenje metastaza mišjeg tumora modifikatorima biološkog odgovora. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*
63. Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP (2004) Protective effect of flavonoides against the toxicity of vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol by inhibition of lipid-peroxidation and increase of liver glutathion. *Haema* 7: 59-67
64. Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS (2005) Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 81(suppl): 284S-91S
65. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* 51(25): 7292-5
66. Lee JC, Kim J, Park JK, Chung GH, Jang YS (2003) The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 291(2): 386-397
67. Lee FYF, Siemann DW, Sutherland RM (1989) Changes in cellular glutathione content during adriamycin treatment in human ovarian cancer-possible indicator of chemosensitivity. *Br. J Cancer* 60: 291-8
68. Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, Kakizuka A (2004) Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* 11: 737-746

- 
69. Manach C, Schalkert A, Morand C, Rémèsy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79(5): 727-747
70. Manolova N, Maximova V, Manolova Z, Stoilova I, Korczak E, Denis A (1987) Immunobiological effect of propolis. I. Effect on Cellular immunity. *Acta Microbiol Bulg.* 21: 76-81 (in Bulgarian)
71. Meister A (1994) Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 54: 1969-75
72. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52(4): 673-751
73. Miller AL (1996) Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev* 1: 103-111
74. Morales MC, Perez-Yarza G, Nieto-Rementería N, Boyano MD, Jangi M, Atencia R, Asumendi A (2005) Intracellular glutathione levels determine cell sensitivity to apoptosis induced by the antineoplastic agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Anticancer Res* 25: 1945-1951
75. Montensinos MC, Ubeda A, Terencio MC, Payá M, Alcaraz MJ (1995) Antioxidant profile of mono- and dihydroxylated flavone derivatives in free radical generating systems. *Z Naturforsch* 50c: 552-60
76. Nadova S, Miadokova E, Cipak L (2007) Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis. *Neoplasma.* 54(3): 202-206
77. Nagy B (1996) Karcinogenezai mutagenezai. U: Turić M, Kolarić ., Eljuga D, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 111-124
78. Narayana KR, Reddy SM, Chaluvadi MR, Krishna DR (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutical potential. *Indian J Pharmacol* 33(1): 2-16
79. Neychev H, Dimov V, Vuleva V, Shirova L, Slacheva E, Gegova G, Manolova N, Bankova V (1988) Immunomodulatory action of propolis. II. Effect of water-soluble fraction on influenza infection in mice. *Acta Microbiol. Bulg.* 23: 58-62
80. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. – Review *Am J Clin Nutr* 74(4): 418-425
81. Oršolic N, Bašić I (2003a) Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacol.* 84(2-3): 265-273
82. Oršolic N, Bašić I (2003b) Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis, caffeic acid phenethyl ester: nitric oxide and macrophage function. *Mellifera.* 3: 56-64

83. Oršolić N, Bašić I (2005a) Water soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J. Ethnopharmacol* 102 (1): 37-45
84. Oršolic N, Bašic I, (2005b) Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomed Pharmacother.* 59(10): 561-570
85. Orsolić N, Bašić I, Cancer Chemoprevention by Propolis and its Polyphenolic Compounds in Experimental Animals. (2007) *Recent Prog. Med. Plants*, 17: 55-113
86. Oršolić N, Bendelja K, Brbot-Šaranović A, Bašić I (2004a) Effects of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid, antioxidants from propolis, on inducing apoptosis in HeLa human cervical carcinoma and Chinese hamster lung V79 fibroblast cells. *Period. biol.* 106: 367-372
87. Oršolić N, Bevanda M, Bendelja K, Horvat-Knežević A, Benković V, Bašić I (2008b) Propolis and related polyphenolic compounds; their relevance on host resistance and interaction with chemotherapy. In: Oršolić N, Bašić I, editors, *Scientific evidence of the use propolis in ethnomedicine. Ethnopharmacology-Review Book.* India: Trivandrum: Research Signpost, 223-250
88. Oršolić N, Brbot Šaranović A, Bašić I (2005a) Direct and indirect mechanism(s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Medica* 72: 1-8
89. Oršolić N, Horvat Knežević A, Basic I (2002) Propolis as a new potential immunomodulator in mice: antimetastatic activity of a water-soluble derivate of propolis (WSDP). *Mellifera* 2-3: 39-46
90. Oršolić N, Horvat-Knežević A, Benković V, Bašić I (2008a) Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. In: Oršolić N, Bašić I editors, *Scientific evidence of the use propolis in ethnomedicine. Ethnopharmacology-Review Book.* India: Trivandrum: Research Signpost, 195-222
91. Oršolić N, Horvat Knežević A, Šver L, Terzić S, Bašić I (2004b) Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 94(2-3): 307-315
92. Oršolić N, Knežević A, Šver L, Terzić S, Hackenberger B, Bašić I (2003a) Influence of honey bee products on transplantable murine tumors. *Vet Comp Oncol.* 1(4): 216-226
93. Oršolic N, Kosalec I, Bašić I (2005b) Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivate of propolis against Ehrlich ascites tumor. *Biol Pharm Bull* 28(4): 694-700

94. Orsolíc N, Saranovic AB, Basic I (2006) Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med* 72(1): 20-27
95. Oršolić N, Štajcar D, Bašić I (2006) Cytotoxicity of propolis and its polyphenolic compounds on primary culture of human urinary bladder transitional cell carcinoma. *Pharmacologyonline* 3: 408-15
96. Oršolic N, Šver L, Terzic S, Tadic Z, Bašic I (2003b) Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastating ability: A possible mode of antitumor action. *Nutr. Cancer*. 47(2): 156-163
97. Oršolić N, Šver L, Terzic S, Tadic Z., Bašić I (2005c) Peroral aplication of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity. *Vet. Res. Comun.* 29(/): 575-93
98. Oršolic N, Terzic S, Mihaljevic Ž, Šver L, Bašic I (2005d) Effect of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on the tumor formation and growth. *Biol. Pharm. Bull.* 28(10): 1928-1933
99. Oršolic N, Terzic S, Šver L, Bašic I (2005e) Polyphenolic compounds from propolis modulate immune responses and increase host resistance to tumor cells. *Food Agricultural Immunology*. 16(3): 165-179
100. Oršolić N, Terzic S, Šver L, Bašic I (2005f) Honey-bee products in preventive and/or terapy of murine translantable tumors. *J. Sci. Food Agric.* 85: 363-370
101. Pavelić K (2000) Molekularno – genetička osnova raka. U: Šamija M i suradnici, ur. *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 19-21
102. Pavelić K (2004) Demistifikacija zloćudnih tumora. U: Pavelić K, ur. *Čuda moderne medicine*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 185-203
103. Pevalek-Kozlina B (2003) Površinska zaštita i obrambene tvari. U: Pevalek-Kozlina B, ur. *Fiziologija bilja*. Zagreb: Profil, 478-485
104. Piantelli M, Tatone D, Castrilli G, Savini F, Maggiano N, Larocca LM, Ranelletti FO, Natali PG (2001) Quercetin and tamoxifen sensitize human melanoma cells to hyperthermia. *Melanoma Res.* 11(5): 469-76
105. Plochmann K, Korte G, Koutsilieri E, Richlina E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P, Scheller C (2007) Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 460: 1-9
106. Prior RL (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 78(Suppl): 570-578
107. Radačić M (1996) Termoterapija i fototerapija tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 250-261

108. Ranaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1 523-6
109. Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. Review. *Curr Med Chem* 8(7): 797-807
110. Roth A (1996) Načela kemoterapije. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 209-225
111. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 16(2): 91-98
112. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Review. *Toxicol* 177(1): 67-80
113. Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G, Ferrandina G, Piantelli M, Bussa S, Rumi C, Cianfriglia M (1994) Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol* 34(6): 459-464
114. Scheller S, Gazda G, Pietsz G, Gabrys J, Szumlas J, Eckert L, Shani J (1988) The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. *Pharm. Res. Commun.* 20: 323-328
115. Schuier M, Sies H, Illek B, H Fischer (2005) Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia. *J. Nutr.* 135(10): 2320-5
116. Shahidi F, Wanasundara PKJPD (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67-103
117. Shen J, Zhang W, Wu J, Zhu Y (2008) The synergistic reversal effect of multidrug resistance by quercetin and hyperthermia in doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia cells. *Int J Hyperthermia.* 24(2): 151-9
118. Slimestad R, Fossen T, Vågen IM (2007) Onions: a source of unique dietary flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 55(25): 10067-80
119. Sobocanec S, Sverko V, Balog T, Saric A, Rusak G, Likic S, Kusic B, Katalinic V, Radic S, Marotti T (2006) Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *J Agric Food Chem.* 54(21): 8018-8026
120. Sorić J (1996) Molekularna biologija tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. *Klinička onkologija*. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 57-86
121. Stavric B (1994) Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. Review. *Clin Biochem* 27(4): 245-248

122. Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z (2006) Epidemiologija raka. U: Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 46-52
123. Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z (2006) Terapijski postupci. U: Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 99-180
124. Taradi M (2004) Imunoreakcija na tumor. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Višnjić D, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada, 313-331
125. Tomek R (2000) Sistemsko liječenje tumora. U: Šamija M i suradnici. ur. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 144-212
126. Toshkov A, Dimov V, Denchev V, Vassilev C (1989) Immunomodulators in infectious Diseases. State Publishing House Medizina i Filskultura, Sofia (in Bulgarian)
127. Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F (2009) Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Epub* .11(6): 355-366
128. Tsushida T, Suzuki M (1996) Content of flavonol glucosides and some properties of enzymes metabolizing the glucosides in onion. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.* 43: 642-649
129. Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal* 2(10): 1214
130. Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes. *Biotechnology Journal* 2 (10): 1235
131. Vita JA (2005) Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 81(suppl): 292S-7S
132. Wachsberger PR, Burd R, Bhala A, Bobyock SB, Wahl ML, Owen CS, Rifat SB, Leeper DB (2003) Quercetin sensitizes cells in a tumour-like low pH environment to hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 19(5): 507-19
133. Wentworth PJr, Jones LH, Wentworth AD, Larsen NA, Wilson IA, Xu X, Goddard WA, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA (2001) Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science* 293: 1806-11
134. Wentworth PJr, Wentworth AD, Zhu X, Wilson IA, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA (2003) Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1 490-3
135. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med* 36(7): 838-849

136. Yamamoto Y, Gaynor RB (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 107 (2): 135-142
137. Yamashita S, Sakane T, Harada M, Sugiura N, Koda H, Kiso Y, Sezaki H (2002) Absorption and metabolism of antioxidative polyphenolic compounds in red wine. *Ann N Y Acad Sci* 957: 325-328
138. Yang C, Landau J, Huang M, Newmark H (2001) Inhibition of cancerogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*. 21: 381-397
139. Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL (2003) Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(6): 1215-1222